

# Über die Charakterisierung und funktionelle Produktion der Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b-Bindeproteins

Vom Fachbereich Chemie



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Thomas Hofmeyer  
aus **Bensheim**

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar  
Korreferent: Prof. Dr. Siegfried Neumann  
Tag der Einreichung: 17. September 2013  
Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2013

Darmstadt 2013

**D17**

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Komplementsystem .....	4
1.2	Das humane C4b-Bindeprotein .....	8
1.3	C4BP als Grundgerüst .....	10
1.4	<i>Yarrowia lipolytica</i> .....	16
1.5	Lip2p Fusionspartner .....	19
1.6	Zielsetzung .....	21
2	Material .....	22
2.1	Organismen .....	22
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	22
2.1.2	<i>Yarrowia lipolytica</i> .....	23
2.2	Plasmide .....	23
2.3	Oligodesoxyribonukleotide .....	25
2.4	DNA-Längenstandards & Protein-Molekulargewichtsmarker .....	28
2.5	Chemikalienliste .....	29
2.6	Enzyme und Proteine .....	30
2.7	Kits .....	31
2.8	Lösungen und Puffer .....	31
2.9	Nährmedien .....	34
2.10	Sonstige Geräte .....	35
2.11	Datenverarbeitungsprogramme .....	37
3	Methoden .....	38
3.1	Mikrobiologische Methoden .....	38
3.1.1	Präparation der verwendeten Geräte und Lösungen .....	38
3.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	38
3.1.3	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Kulturen .....	38
3.1.4	Lagerung von <i>E. coli</i> Zellen .....	38
3.1.5	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen .....	38
3.1.6	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Kulturen .....	39

---

3.1.7	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	39
3.1.8	Bestimmung der Zelldichte .....	39
3.1.9	Lagerung von <i>Y. lipolytica</i> .....	39
3.1.10	Transformation von <i>Y. lipolytica</i> .....	40
3.1.11	Trypanosomen Bindungstest .....	40
3.2	Proteinchemische Arbeitsmethoden .....	41
3.2.1	Produktion von Thioredoxin-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .....	41
3.2.2	Überprüfung der Expression ausgewählter Einzelklone .....	42
3.2.3	Expression im analytischen Maßstab .....	42
3.2.4	Proteinproduktion im Fermenter .....	43
3.2.5	Aufschluss durch <i>French-pressing</i> .....	43
3.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	43
3.2.7	<i>Blue native</i> - Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) .....	45
3.2.8	Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern ( <i>Western Blot</i> ) .....	46
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	47
3.2.10	Dialyse .....	48
3.2.11	Konzentration von Proteinen durch Ultrafiltration .....	48
3.2.12	TEV-Protease-Spaltung .....	48
3.2.13	Chemische Kopplung von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid .....	48
3.2.14	Gefriertrocknung .....	49
3.2.15	Circular dichroismus Spektroskopie .....	49
3.2.16	Thermofluormessung .....	50
3.2.17	<i>Dynamic light scattering</i> .....	50
3.2.18	Lipase-Aktivitätstest in Mikrotiterplatten .....	50
3.2.19	Protease-Inhibitionstest .....	51
3.2.20	ABTS-Test .....	51
3.3	Säulenchromatographische Methoden .....	52
3.3.1	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC) .....	52
3.3.2	Immobilisierte Metall Ionen Affinitätschromatographie (IMAC) .....	52
3.3.3	Gelfiltrationschromatographie (GFC) .....	53
3.3.4	Ionenaustauschchromatographie (IEX) .....	53

---

3.4	Molekularbiologische Methoden .....	54
3.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	54
3.4.2	Fällung von DNA mit Ammoniumacetat und Ethanol .....	54
3.4.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	54
3.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	55
3.4.5	Extraktion von DNA aus einem Agarosegelen.....	55
3.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	55
3.4.7	PCR ( <i>Polymerase chain reaction</i> ) .....	56
3.4.8	Kolonie-PCR.....	58
3.4.9	Modifikation von Plasmid-DNA mittels PCR.....	58
4	Ergebnisse und Diskussion .....	60
4.1	Strukturanalyse der C4BP Oligomerisierungsdomäne .....	60
4.1.1	Produktion und Reinigung von C4BP.....	61
4.1.2	Sekundärstrukturanalyse .....	62
4.1.3	SeMet Markierung.....	63
4.1.3.1	Charakterisierung von Einzelklonen .....	65
4.1.4	SeMet markiertes C4BP .....	66
4.1.4.1	Reinigung und Analyse .....	67
4.1.5	Kristallisation.....	69
4.1.6	Beschreibung der Struktur .....	71
4.1.7	C4BP $\beta$ -Kette .....	76
4.1.8	Denaturierung und Renaturierung.....	77
4.1.9	MD-Simulationen: <i>in silico</i> Assemblierung der C4BP-Isoformen .....	79
4.1.10	Diskussion.....	85
4.2	Untersuchung von Stabilität und Funktionalisierung.....	90
4.2.1	C4BP Produktion ohne Trx.....	90
4.2.2	C-terminale Verkürzung.....	92
4.2.3	N-terminale Verkürzung.....	96
4.2.4	Untersuchung der Thermostabilität.....	98
4.2.5	Thermofluor Messungen .....	99



---

4.2.6	Weitere hC4BP Mutanten.....	103
4.2.7	Bioorthogonale Konjugation.....	106
4.2.7.1	N-terminale Modifikation mit FTSC .....	107
4.2.7.2	Modifikation durch Protein-Spleißen mit <i>split</i> -Inteinen in <i>trans</i> .....	108
4.2.8	Diskussion .....	113
4.3	<i>Yarrowia lipolytica</i> .....	121
4.3.1	Klonierung und genomische Integration.....	121
4.3.2	Expression im analytischen Maßstab.....	123
4.3.3	Expression im präparativen Maßstab.....	125
4.3.4	Überprüfung der Bioaktivität.....	128
4.3.4.1	Tryp-VHH .....	128
4.3.4.2	Miniprotein.....	129
4.3.4.3	Goase M1 .....	130
4.3.5	Diskussion .....	131
5	Zusammenfassung & Ausblick.....	135
6	Literaturverzeichnis.....	137
7	Anhang.....	160
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	160
7.2	Vorveröffentlichungen der Dissertation .....	163
7.3	Danksagung.....	164
7.4	Erklärungen.....	166
7.5	Abriss des Lebens- und Bildungsganges .....	168

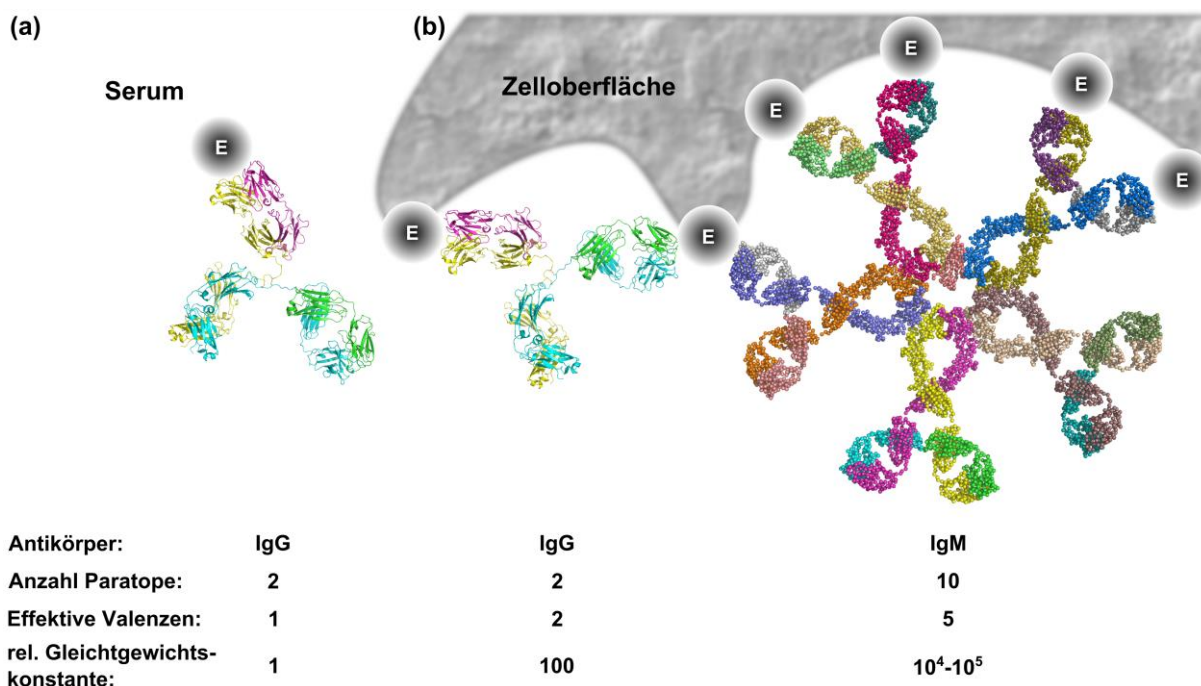
---

## 1 Einleitung

---

Komponenten des Immunsystems spielen seit ca. zwei Jahrzehnten in der Therapie einer Reihe von Erkrankungen eine zentrale Rolle. Eine besondere Stellung nehmen hier vor allem Antikörper ein, was sich in der steigenden Zahl von zugelassenen Antikörper-basierten Medikamenten zeigt. Seit 1998 wurde jedes Jahr (mit Ausnahme 2002 und 2008) mindestens ein Antikörperpräparat in Europa zugelassen.<sup>1</sup> Die Wirkungsweise von monoklonalen Antikörpern (mAbs) kann hierbei sehr vielseitig sein. Auf der Oberfläche vieler Tumorzellen werden beispielsweise Rezeptoren wie EGFR (*epidermal growth factor receptor*) überexprimiert. Ein antagonistischer mAb wie Erbitux® kann EGFR spezifisch binden und alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika die Tumorprogression hemmen. Für die Wirkung werden verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen: durch die Interaktion von Erbitux® wird die Bindung von EGF (*epidermal growth factor*) an seinen Rezeptor EGFR blockiert, eine Aktivierung des Signaltransduktion durch Rezeptor-Dimerisierung verhindert und die Rezeptor-Internalisierung und Degradierung erhöht.<sup>2</sup> Therapeutische mAbs bedienen sich darüber hinaus zumeist körpereigener Mechanismen, um zytotoxische Effekte zu Tumorzellen zu dirigieren.<sup>3</sup> Hierbei rekrutieren sie Komponenten des Immunsystems ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) und oder des Komplementsystems CDC (*complement-dependent cytotoxicity*) zur Zerstörung von Tumorzellen. ADCC tritt auf, wenn Antikörper über ihre Paratope an Antigene auf einer Zelloberfläche von veränderten körpereigenen Zellen binden und mit dem Fc-Rezeptor von natürlichen Killerzellen (NK) interagieren. Die NK erkennen über ihren FcγRIII-Rezeptor (CD16) das Immunglobulin und leiten die Apoptose der markierten Zelle ein. Bei CDC findet eine Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg (auch Antikörper-abhängiger Weg genannt) statt. Hierbei wird über die Bindung des C1-Komplex an die Fc-Teile der Antigen-Antikörper-Komplexe die Komplementkaskade aktiviert, die letzten Endes über die Etablierung lytischer Poren in der Zellmembran der betroffenen Zelle zu deren Lyse führt (siehe 1.1).

Eine immer wiederkehrende Besonderheit bei Komponenten des Immunsystems ist die Bereitstellung von Bindedomänen in multipler Kopienzahl. Beispielsweise verfügen Immunglobuline über zwei (IgG), vier (IgA) oder 10 (IgM) Paratope. Hierbei wird die Stärke der Bindung eines Antikörpers zu seinem monovalenten Antigen als Affinität bezeichnet. Die Summe der Bindungsstärken eines Moleküls mit mehr als einer Bindestelle wird dagegen Avidität genannt (Abb. 1).<sup>4</sup>



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Aviditätseffektes anhand der multivalenten Bindemoleküle IgG und IgM. **(a)** das Immunglobulin G bindet ein monovalentes Antigen, hier als ein im Serum gelöstes Epitop (E) dargestellt **(b)** IgG und IgM binden an sich wiederholende Epitope auf einem multivalenten Antigen, hier bspw. Kohlehydrate oder Proteine auf einer Zelloberfläche; Immunglobulin G (PDB ID: 1IGT<sup>5</sup>) in Cartoon-Darstellung und IgM (PDB ID: 2RCJ<sup>6</sup>) in *sphere*-Darstellung. (Modifiziert nach <sup>7,8</sup>)

Bindet ein multivalentes Immunglobulin einen Liganden mit sich wiederholenden identischen Epitopen, können mehrere Paratop-Epitop-Bindungen gleichzeitig etabliert werden. Die Avidität ist hierbei um ein vielfaches stärker als die Affinität einer einzelnen Bindung, da alle Paratope eines multivalenten Antikörpers zur selben Zeit dissoziieren müssten, um das Antigen wieder freizugeben. Diese Bindungsstärke ist wichtig, denn je besser ein Antikörper sein Antigen bindet desto weniger Antikörper werden benötigt um das Antigen zu eliminieren.

Es ist daher naheliegend, solche Aviditätseffekte auch in Anwendungen der molekularen Biotechnologie und molekularen Medizin einzusetzen. Der Aviditätseffekt ist hierbei allerdings nicht auf Immunglobuline beschränkt. Neben klassischen Antikörpern werden hierbei Antikörperfragmente aber auch völlig neuartige Bindemoleküle wie Anticaline oder DARPINS (*designed ankyrin repeat proteins*) verwendet.<sup>9-11</sup> Die Generierung dieser spezifischen Bindemoleküle wird heutzutage mittels Hochdurchsatzverfahren realisiert. Hierbei werden mithilfe verschiedener Display-Methoden (z.B. Phagen- oder Hefe-Display) über Genotyp-Phänotyp-Kopplung zum Teil riesige Molekülbibliotheken durchmustert. Aufgrund experimenteller Limitierungen bei der Erstellung dieser Bibliotheken und beim Screening selbst werden zumeist monovalente Bindemoleküle generiert.<sup>12</sup> Je nach gewünschtem Anwendungsgebiet und erforderlichlichem Oligomerisierungsgrad stehen im Nachhinein

unterschiedlichste Methoden für eine Oligomerisierung der isolierten Bindemoleküle zur Verfügung. Zum einen kann eine Vernetzung chemisch erfolgen bspw. mit Hilfe von Vernetzungsmitteln (*cross-linker*) oder durch chemische Kopplung an bspw. Peptidgrundgerüste oder Nanopartikel.<sup>13-15</sup> Des Weiteren können die Bindemoleküle nach dem Vorbild der Natur an einem entsprechenden Grundgerüst (*scaffold*) befestigt werden. Neben der Generierung eines Aviditätseffektes können je nach Art des Grundgerüsts weitere Eigenschaften auf die Bindemoleküle übertragen werden z.B. Löslichkeit, Stabilität, Immunogenität oder Orientierung zueinander im Raum. In Tabelle 1 ist eine Auswahl von Oligomerisierungsdomänen zusammengestellt. Eine nähere Betrachtung einiger dieser Proteine erfolgt in Abschnitt 4.2.8.

**Tabelle 1:** Auswahl von in der Literatur beschriebenen Oligomerisierungsdomänen. Neben dem Grad der Oligomerisierung ist die Komposition der Untereinheiten angegeben. Nx: Homo-N-mer, Nxyz Heterooligomer.

Name	Oligomerisierungsgrad
PCNA ( <i>proliferating cell nuclear antigen</i> ) <sup>16</sup>	Trimer (3x oder xyz)
RHCC ( <i>right handed coiled coil</i> ) <sup>17</sup>	Tetramer (4x)
COMP/ COMBODY ( <i>cartilage oligomeric matrix protein</i> ) <sup>17</sup>	Pentamer (5x)
Verotoxin ( <i>E. coli</i> ) <sup>18</sup>	Pentamer (5x)
Tim9Tim10 <sup>8</sup>	Hexamer (3x3y)
C4BP ( <i>complement component C4b binding protein</i> ), (siehe 1.3)	Heptamer (7x)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die heptamere Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b-Bindeproteins als strukturelles Grundgerüst für die Multimerisierung biologisch aktiver Bindemoleküle erschlossen. Um Limitierungen bei der rekombinanten Synthese von C4BP-Fusionsproteinen zu überwinden, wurden darüber hinaus Methoden zur posttranslationalen Modifizierung evaluiert und ein gut anwendbares Verfahren zur rekombinanten Synthese komplexer Disulfid-haltiger Proteine im Produktionssystem *Yarrowia lipolytica* etabliert.

Die in dieser Arbeit untersuchte Oligomerisierungsdomäne hat ihren Ursprung im Komplementsystem. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf der Einleitung zunächst ein Überblick zu diesem essentiellen Teil der körpereigenen Immunantwort gegeben (1.1). Danach wird das C4b-Bindeprotein in seinem physiologischen Kontext vorgestellt (1.2), bevor im nächsten Kapitel anhand einer Übersicht früherer Veröffentlichungen die biotechnologischen Anwendungsmöglichkeiten der Oligomerisierungsdomäne aufgezeigt werden (1.3). Im Anschluss wird die nicht-konventionelle Hefe *Yarrowia lipolytica* vorgestellt (1.4), ein Organismus mit vielversprechendem biotechnologischen Potenzial. Im Rahmen dieser Arbeit

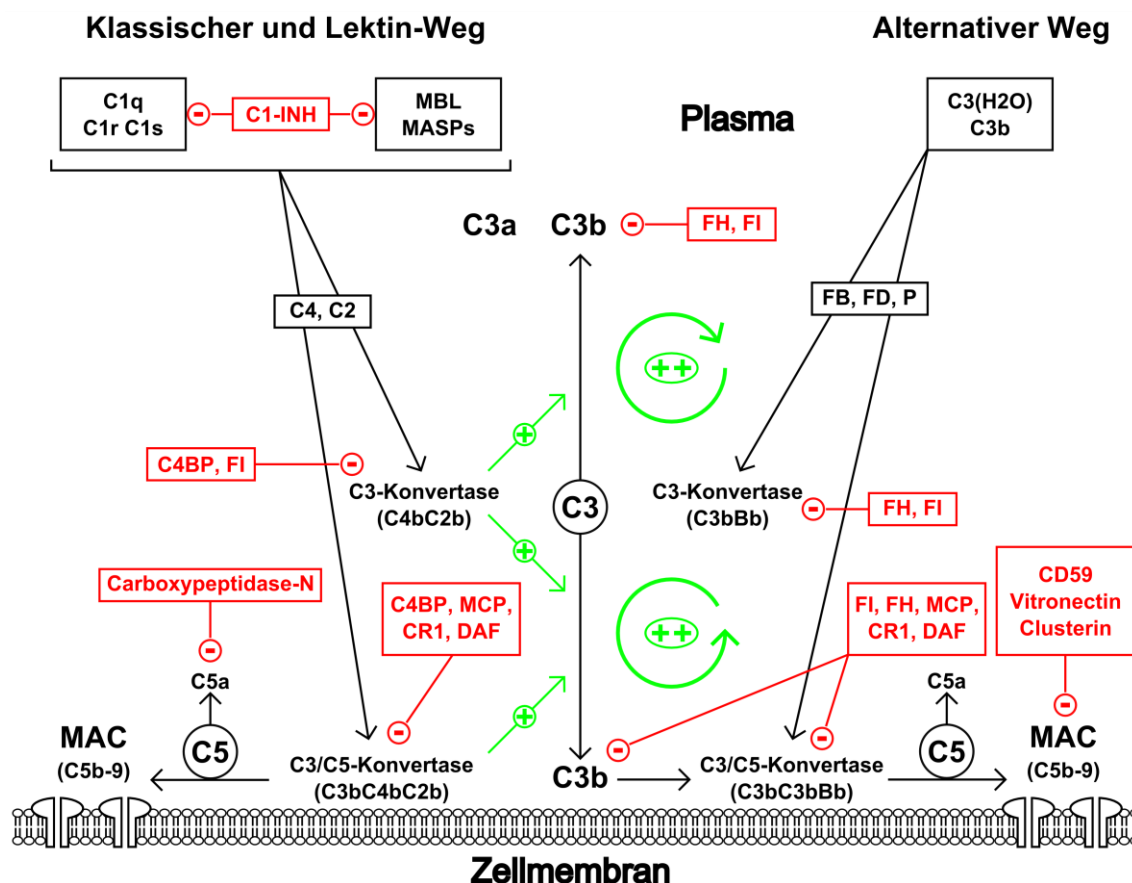
---

wurde die Fähigkeit dieses eukaryotischen Expressionssystems zur Produktion verschiedener Fusionsproteine evaluiert (1.5). Abschließend erfolgt die Formulierung der Zielsetzung (1.6).

## 1.1 Komplementsystem

Das Komplementsystem wurde bereits 1890 von Jules Bordet als hitzelabiler Bestandteil des Blutplasmas entdeckt, der in Kombination mit Antikörpern bakterizide Eigenschaften besitzt.<sup>19</sup> Paul Ehrlich prägte kurz darauf den Begriff Komplementsystem um damit die ergänzende oder komplementierende Eigenschaft des Serumbestandteils bei der Zelllyse zu beschreiben. Das Komplementsystem stellt eine angeborene Verteidigung gegen Mikroorganismen dar und ist darüber hinaus eine Ergänzung der Antikörper-vermittelten Immunantwort. Es rekrutiert sich aus ca. 60 im Plasma gelösten und membrangebundenen Proteinen, über deren Interaktion das System aktiviert, körpereigene von fremden Zellen unterschieden und deren Bekämpfung gesteuert wird.<sup>20</sup> Viele dieser Proteine verhindern eine unspezifische Aktivierung oder dienen der Unterscheidung körpereigener von pathogenen Zellen. Dieser angeborene Teil des Immunsystems steht dem Körper bereits in den ersten Lebensmonaten zur Verfügung, in denen weder spezifische Antikörper noch Lymphozyten vorhanden sind. Einer Aktivierung des Komplementsystems können prinzipiell drei unterschiedliche Wege zu Grunde liegen: der klassische Weg (KW), der Lektin-Weg (LW) und der alternative Weg (AW), siehe Abb. 2, Erklärung im Text. Nach der Aktivierung schließt sich bei allen drei Wegen eine proteolytische Kaskade an, die über die Assemblierung der beiden Schlüsselproteine C3- und C5-Konvertase zur Etablierung des *terminal complement complex* (TCC) oder auch *membrane attack complex* (MAC) genannt zur Lyse von Pathogenen oder veränderten endogenen Zellen führt.<sup>4</sup>

Seit knapp drei Jahrzehnten gibt es eine Kontroverse über die Nomenklatur der C3-/C5-Konvertase-Untereinheiten des KW und LW. Im Folgenden wird durchgehend die neue Nomenklatur der Konvertase-Untereinheiten verwendet. Nach dieser wird das kleine nichtkatalytische Fragment von C2 als C2a und das in den C3-/C5-Konvertasen des KW und LW enthaltene Fragment als C2b bezeichnet. In Analogie zur AW-Konvertase (C3bBb) rekrutieren sich die KW und LW Konvertasen aus C4bC2b.<sup>21</sup>



**Abb. 2:** Aktivierung und Regulierung des Komplementsystems (vereinfachte, schematische Übersicht). Der klassische und der Lektin-Weg werden über die Erkennung von Antigen-Antikörper-Komplexen bzw. PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) initiiert. Der alternative Weg liegt durch spontane Hydrolyse von C3 permanent zu einem geringen Maß aktiviert vor. Die Spaltung von C3 ist der kritische Schritt im Zuge der Komplementaktivierung. Durch entsprechende Stimulation erfolgt ein Fortschreiten der Komplementantwort (*amplification loop*; grüne Kreispfeile). Homöostase und Selbsterkennung werden durch diverse lösliche und membrangebundene Proteine reguliert (Kästen) die entweder die proteolytische Inaktivierung von C3b/C4b katalysieren (MCP, CR1, FH, C4BP) oder die Konvertase-Dissoziation beschleunigen (DAF, CR1, FH, C4BP). FB, FD, FH, FI: Faktor B, D, H bzw. I; C1-INH: C1 bzw. MASPs Inhibitoren; P: Properdin; MCP: *membrane cofactor protein* (CD46); CR1: *complement receptor 1*; DAF: *decay-accelerating factor* (CD55); MAC: *membrane attack complex*; CD59: *MAC-inhibitory protein*. (Modifiziert nach Cordoba *et al.* 2012<sup>22</sup>)

Der klassische Weg wird durch die Bindung des C1 Komplex (6C1q, 2C1r, 2C1s) an einen Immunkomplex aus IgG oder IgM Antikörpern und deren Antigenen bzw. direkte Bindung an konservierte Epitope auf der Oberfläche von Pathogenen initiiert. Durch die Bindung von C1 über C1q an ein IgM oder mehrere IgG Antikörper wird dessen Serinprotease C1s aktiviert.<sup>23</sup> Als Substrat dieser Protease werden die beiden Komplementproteine C4 und C2 jeweils in ein größeres (C4b und C2b) und ein kleineres (C4a und C2a) Fragment gespalten.<sup>24</sup> Das entstandene C4b bindet über einen Thioester kovalent an die Oberfläche der Zielzelle und assembliert mit C2b zur C3-Konvertase (C4bC2b) des klassischen Weges.<sup>25</sup>

Die Aktivierung über den Lektin-Weg wird durch die Bindung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) oder Ficolin an Kohlenhydrate (z.B.: N-Acetylglucosamin, Mannose, N-

Acetylmannosamin) auf Bakterienoberflächen eingeleitet.<sup>26</sup> Der MBL/ Ficolin Proteinkomplex ähnelt vom Aufbau dem Initiator des klassischen Weges C1 und verfügt mit den MBL assoziierten Serinproteasen (MASP) ebenfalls über die Möglichkeit C4 und C2 zu degradieren.<sup>23</sup> Analog zum klassischen Weg führt die Aktivierung des Lektin-Weges über die Assemblierung der C3-Konvertase (C4bC2b) zum Start der proteolytischen Komplementkaskade.

Der alternative Weg (AW) wird spontan durch die Hydrolyse von C3 ( $C3_{H_2O}$ ) eingeleitet. Das hydrolysierte  $C3_{H_2O}$  bindet die Protease Faktor B, die wiederum von Faktor D gespalten wird. Hierbei entsteht eine größtenteils löslich vorliegende C3-Konvertase ( $C3_{H_2O}Bb$ ) und setzt ihr Substrat C3 in C3a und C3b um. Durch die Spaltung wird im C3b Fragment ein Thioester freigelegt über den C3b kovalent an Amine und Kohlenhydrate binden kann, was zur Opsonisierung von Fremdkörpern führt.<sup>27</sup> Zum anderen kann der AW über die Bindung von Properdin (P) an PAMPs oder DAMPs gestartet werden. Hierbei lockt das oligomere Protein lösliches C3b zu den entsprechenden Oberflächen und stabilisiert die *de novo* Assemblierung der C3-Konvertase (C3bBbP) aus C3b, Faktor B und D.<sup>28; 29</sup> Durch die spontane Hydrolyse von C3 werden permanent Zelloberflächen überprüft (*tick-over*). Handelt es sich um intakte körpereigene Strukturen verhindert die Selbsterkennung bzw. das Vorhandensein von Regulatoren eine Amplifikation der Komplementkaskade.<sup>30</sup>

Die oberflächengebundenen C3-Konvertasen, gleich welchen Ursprungs (C4bC2b, C3bBbP), produzieren C3b, welches sich über den freigespaltenen Thioester in unmittelbarer Nähe anlagert und mit Faktor B und D neue C3-Konvertasen bildet. Es entsteht ein effektiver Kreislauf aus C3 Spaltung und Neusynthese von C3-Konvertase. Mit zunehmender C3b-Konzentration kommt es durch die Anlagerung eines weiteren C3b-Moleküls an die bestehenden C3-Konvertasen zu einer Verschiebung der Substratspezifität von C3 zu C5. Aufgrund der veränderten Substratspezifität werden diese Enzymkomplexe (C4bC2bC3b und C3bBbC3b) C5-Konvertasen genannt.<sup>31; 32</sup> Sie katalysieren die Spaltung von C5 in das Anaphylatoxin C5a und das größere Fragment C5b. Letzteres assoziiert mit den Komplementkomponenten C6 bis C9 an der Zelloberfläche ( $C5bC6-C9_n$ ) und etabliert sukzessive eine Pore in der Membran der betroffenen Zelle. Der MAC als zylinderförmige Läsion stört nachhaltig die Permeabilität der Membran wodurch die betroffene Zelle abgetötet wird.<sup>33; 34</sup> Die meisten der kleineren Fragmente, welche im Laufe der Komplementkaskade entstehen (C3a, C4a und C5a), vermitteln als Anaphylatoxine die Entstehung einer Entzündungsreaktion oder locken als Attraktanten Leukozyten an.<sup>35</sup>

Darüber hinaus sind einige Serinproteasen des Koagulationssystems (XIa, IXa, Xa, Thrombin und Plasmin) in der Lage, die Komplementkomponenten C3 und C5 zu spalten und unabhängig von



---

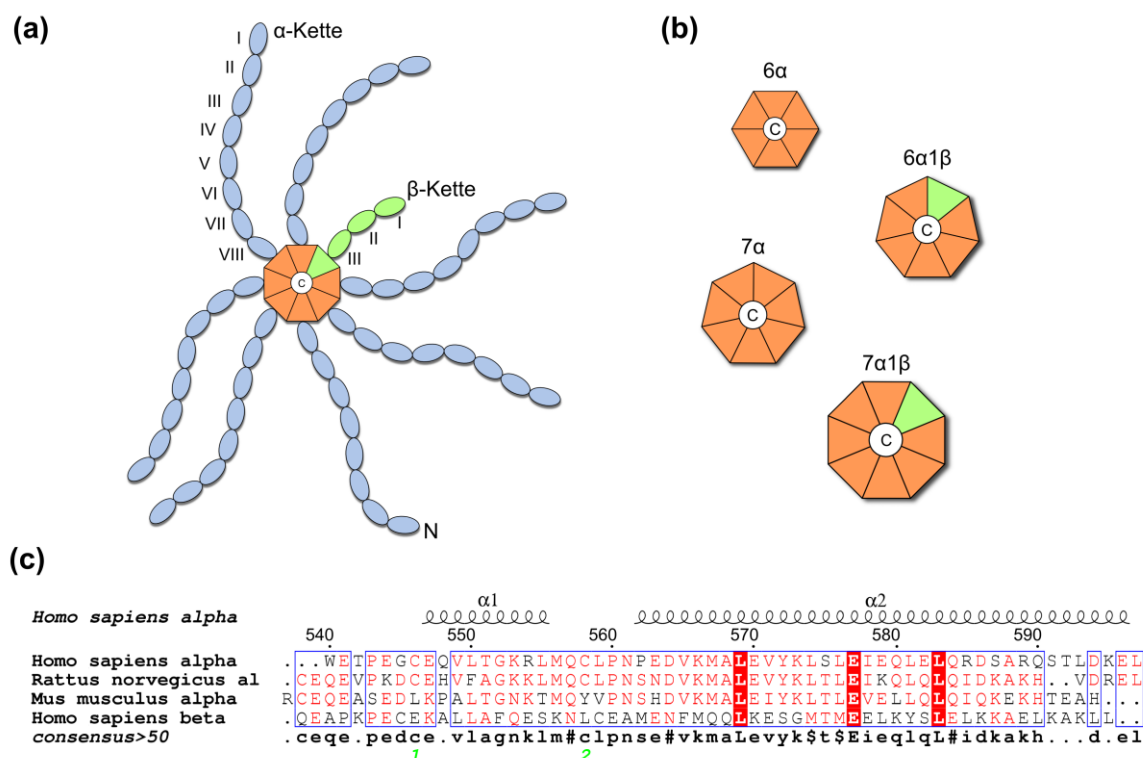
den eingangs erörterten Aktivierungswegen die Assemblierung des MAC zu initiieren.<sup>36</sup> Andersherum ist das Komplementsystem beispielsweise über den C4BP-Protein-S Komplex (siehe Abschnitt 1.2) wiederum mit dem Koagulationssystem verbunden.<sup>37</sup> Im vergangenen Jahrzehnt hat sich herausgestellt, dass das Komplementsystem neben der Abwehr von Mikroorganismen mit einer Vielzahl anderer Systeme verknüpft ist und maßgeblich an essentiellen Funktionen wie Immunüberwachung, Homöostasis und Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt ist.<sup>21; 38</sup> Ein Ungleichgewicht dieses komplexen und bis heute nicht vollständig aufgeklärten Zusammenspiels ist mit sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern assoziiert (Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses, eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen oder hereditäre Angioödeme) und verdeutlicht die Notwendigkeit einer effektiven Regulation.<sup>22</sup> Aus diesem Grund sind viele der am Komplementsystem beteiligten Proteine Teil dieser Regulation.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Fragment eines dieser Regulatoren: die C-terminale Oligomerisierungsdomäne der  $\alpha$ -Kette des humanen C4b-Bindeproteins (C4BP). In den nächsten beiden Abschnitten wird das ganze Protein in seinem physiologischen und die Oligomerisierungsdomäne im biotechnologischen Kontext vorgestellt.



## 1.2 Das humane C4b-Bindeprotein

Das humane C4b-Bindeprotein (hC4BP) ist ein glykosyliertes Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 570 kDa und wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. hC4BP ist einer der wichtigsten Inhibitoren des Komplementsystems (KW und LW). Für das hC4BP sind beim Menschen vier Isoformen bekannt, siehe Abb. 3.



**Abb. 3:** (a) Schematische Darstellung der Hauptisoform (7α1β) des humanen C4BP. Die sieben α-Ketten und die solitäre β-Kette bestehen aus 8 beziehungsweise 3 CCPs, und sind über ihre C-terminalen Oligomerisierungsdomänen verbunden. (b) Zusammenstellung aller bis jetzt beobachteten Oligomerisierungsdomänen des hC4BP, von oben nach unten: 6α, 6α1β, 7α und 7α1β. (c) Alignment der C4BP α- und β-Ketten von *Homo sapiens*, *Mus musculus*, and *Rattus norvegicus*. Der Sequenzvergleich wurde mit den Programmen MultAlin<sup>39</sup> durchgeführt und mit ESPrict 2.2 abgebildet.<sup>40</sup> Informationen zur Sekundärstruktur stammen aus dieser Arbeit (PDB ID: 4B0F); Aminosäuren welche identisch zum hC4BP sind wurden in Rot dargestellt; rot umrandete Aminosäuren sind in allen verglichenen Sequenzen konserviert; ein blauer Rahmen zeigt mindestens zwei konservierte Aminosäuren an. Die Nummerierung wurde anhand der hC4BP Sequenz durchgeführt. Die Konsensussequenz (unterste Zeile) wurde mit einem Schwellenwert von 0,5 berechnet; Majuskel symbolisieren identische Aminosäuren, Minuskel einen Konsensus >0,5; \$ steht für LM; # steht für eine der Aminosäuren NDQEBZ. Die grünen Zahlen zeigen die Position der Cysteine an. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Die am häufigsten vorkommende Isoform besteht aus 7 identischen α- und einer β-Kette, weniger oft auftretende Isoformen sind 6α1β, 7α und 6α. Eine α-Kette besteht aus acht complement control domain proteins (CCPs) und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne mit einem Gesamtgewicht von 75 kDa. Die β-Kette mit einem Molekulargewicht von 40 kDa

besteht hingegen aus drei CCPs und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne. Ungeachtet der Untereinheitenzusammensetzung zeigen alle Isoformen eine für das C4BP charakteristische spinnenartige Quartärstruktur.<sup>37</sup> Bei den meisten Organismen erfolgt der kovalente Zusammenschluss der einzelnen Ketten über die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen den benachbarten, etwa 60 AS langen C-terminalen Oligomerisierungsdomänen. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Sequenzhomologie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sehr gering ist und nach heutigem Stand der Forschung völlig unklar ist, wie die Assemblierung der unterschiedlichen Isoformen reguliert wird.<sup>42</sup>

C4BP moduliert den Lektin-Weg und den klassischen Weg durch Bindung an C4b via positiv geladener Bereiche auf der Oberfläche der ersten drei CCPs der  $\alpha$ -Ketten.<sup>43</sup> Durch die Bindung an C4BP kann C4b keine Komplexe mehr mit C2b und C3b ausbilden und wird darüber hinaus verstärkt durch Faktor I proteolytisch gespalten. Hierdurch wird die Bildung der C3/C5 Konvertase (C4bC2b/ C3b) inhibiert und die proteolytische Kaskade des Komplementsystems unterbrochen.<sup>44</sup> Jede C4BP  $\alpha$ -Kette ist in der Lage C4b zu binden, wegen sterischer Hinderung können jedoch nur vier C4b Moleküle gleichzeitig gebunden werden.<sup>45</sup> Die  $\beta$ -Kette des hC4BP bindet nicht an C4b, zeigt aber eine hohe Affinität zu Protein S, welches seinen Ursprung im Koagulationssystem hat. Dort ist Protein S ein Kofaktor von aktiviertem Protein C und essentiell für die Degradierung der Koagulationsfaktoren Va und VIIIa. Protein S, das an C4BP gebunden ist, kann nicht mehr als Kofaktor von Protein C auftreten. Interessanterweise liegen 70% von Protein S im menschlichen Serum im Komplex mit C4BP vor, was als direkte Verbindung des Komplementsystems mit dem Koagulationssystem verstanden werden kann.<sup>37</sup>

Für die CCP Domänen des C4BP sind eine Reihe von Interaktionen bekannt. Für die C-terminale Oligomerisierungsdomäne inklusive von Teilen der CCP8 wurden hingegen bisher erst wenige Interaktionen nachgewiesen. Diese Interaktionspartner sind *serum amyloid P*,<sup>46</sup> A $\beta$ 1–42,<sup>47</sup> *islet amyloid polypeptide*,<sup>48</sup> und *C-reactive protein*.<sup>49</sup> Des Weiteren ist das C4BP ein Akute-Phase-Protein, dessen Plasma Level mit dem Verlauf von Infektionen und Entzündungen korreliert. Cytokine wie beispielsweise IL-6, IL- $\beta$  und INT- $\gamma$  scheinen hierbei für eine verstärkte Sekretion des C4BP verantwortlich zu sein.<sup>50</sup> Serum Level der verschiedenen C4BP Isoformen scheinen des Weiteren mit dem Verlauf von Krankheiten und Entzündungen zu korrelieren.<sup>51</sup> Beispielsweise wurde bei Patienten mit *critical limb ischemia* eine verstärkte Bindung von nekrotischen und apoptotischen Zellen an C4BP beobachtet, sowie ein zeitgleicher Anstieg der 7 $\alpha$ -Isoform im Plasma.<sup>52</sup> Interessanterweise ist eine Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen in der Lage, sich durch Interaktion konservierter Membranproteine mit C4BP zu dekorieren, um so einer

---

Immunantwort zu entgehen.<sup>53</sup> Die Identifizierung weiterer Oberflächenproteine, welche C4BP immobilisieren können, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.<sup>54; 55</sup>

Zusätzlich zu dem faszinierenden physiologischen Kontext des C4BP, hat sich vor allem die C-terminale Oligomerisierungsdomäne der 7 $\alpha$ -Isoform als vielversprechendes biotechnologisches Werkzeug erwiesen. Die Oligomerisierungsdomäne kann als *scaffold* für Peptide während einer Immunisierung für eine erhöhte Plasmahalbwertszeit sorgen und des Weiteren durch seine Herkunft aus dem Immunsystem als Adjuvans zu einer verstärkten Immunreaktion führen.<sup>56-59</sup> Detailliertere Informationen hierzu folgen im nächsten Abschnitt (1.3).

Bis jetzt ist nur wenig über die Struktur des hC4BP bekannt. Die einzige bei der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegte Struktur ist eine NMR-Messung welche die beiden N-terminalen CCPs der  $\alpha$ -Kette beschreibt (PDB ID: 2A55).<sup>60</sup> Vor kurzem wurde von Lea *et al.* die Kristallstruktur der 7 $\alpha$ -Oligomerisierungsdomäne des *Gallus gallus* C4BP veröffentlicht (PDB ID: 2Y2F, eine begleitende Publikation war bis zum Erscheinen der vorliegenden Arbeit nicht verfügbar). Im Vergleich zum humanen C4BP zeigt dieses Protein allerdings nur eine Sequenzidentität von ~26%. Für die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP waren bis vor kurzem nur computergestützte Strukturvorhersagen und eine NMR-Messung verfügbar, die jedoch keine eindeutige Auflösung der Struktur ermöglichten.<sup>61; 62</sup>

Trotz fehlender Strukturinformationen wird die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des C4b-Bindeproteins seit gut 15 Jahren biotechnologisch verwendet. Im folgenden Abschnitt wird ein Großteil der bisher zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten vorgestellt.

### 1.3 C4BP als Grundgerüst

Die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP wurde 1997 erstmals von Libyh *et al.* als Grundgerüst zur Oligomerisierung eingesetzt.<sup>63</sup> Seit dem sind etwa ein Dutzend Publikationen erschienen in denen die humane, ihr homologe oder chimäre Fragmente der Oligomerisierungsdomäne als Grundgerüst zur Präsentation von Peptiden oder Proteinen verwendet wurde. In Tabelle 2 ist eine Übersicht zu den veröffentlichten Arbeiten zusammengestellt.

**Tabelle 2:** Zusammenstellung der Publikationen in denen eine auf C4BP-basierende Oligomerisierungsdomäne als Grundgerüst verwendet wurde. Die Auflistung erfolgt chronologisch nach den Publikationsdaten. Neben den entsprechenden Veröffentlichungen sind die fusionierten Proteine/ Peptide angegeben. Des Weiteren werden die Art der Oligomerisierung, Anwendung und das verwendete Expressionssystem aufgeführt. RBC: rote Blutkörperchen, *H.s.*: *Homo sapiens*, *G.g.*: *Gallus gallus*, *M.m.*: *Mus musculus*, C: Chimäre, HoO: Homooligomer, HeO: Heterooligomer; HA: Glycoprotein Hämagglutinin; vvvd: *viral vectored vaccine delivery* (DNA, MVA und AdHu5)

Publikation	Fusionspartner	Oligomer	Anwendung	Produktion
Libyh 1997 <sup>63</sup>	scFV Anti-Rh(D)	<i>H.s.</i> , HoO	Bindung von Rh(D) <sup>+</sup> RBCs	CHO
Shinya 1999 <sup>64</sup>	CD4	<i>H.s.</i> , HoO	HIV Entry-Inhibitor	HEK
Christiansen 2000 <sup>65</sup>	C46	<i>H.s.</i> , HoO	Adjuvans vs. HA auf Masernvirus	CHO
Oudin 2000 <sup>66</sup>	scFv Anti-Rh(D) CR1	<i>H.s.</i> , HoO & HeO	Bindung von Rh(D) <sup>+</sup> RBCs und CR1 Deposition	CHO
Dervillez 2006 <sup>56</sup>	C46	<i>H.s.</i> , 1/2/7, HoO	HIV Entry-Inhibitor	HEK
Draper 2008 <sup>57</sup>	MSP1 <sub>42</sub>	<i>M.m.</i>	Adjuvans vs. Malaria	vvvd
Ogun 2008 <sup>59</sup>	MSP1 <sub>19</sub> , DsbA, Epitope	<i>H.s.</i> , <i>G.g.</i> , <i>M.m.</i> , div. C u.a. IMX313, HoO	Adjuvans vs. Malaria	<i>E. coli</i> C41(DE3)
Shinya 2009 <sup>67</sup>	hGM-CSF	<i>H.s.</i> , HoO	iDCs aus PBMC	HEK
Kessel 2009 <sup>58</sup>	p107, C6, H10	<i>H.s.</i> , HoO & HeO	Inhibition von FVIII AKs	HEK
Spencer 2012 <sup>68</sup>	Ag85A	IMX313	Adjuvans vs. Tuberkulose	vvvd, CEF
Forbes 2012 <sup>69</sup>	PyMSP1 <sub>42</sub> PfAMA1 PfM128	IMX108 (= <i>M.m.</i> ), IMX313	Adjuvans vs. Malaria	vvvd
Goodmann 2013 <sup>70</sup>	MSP1 <sub>19</sub>	<i>M.m.</i> , HoO	Adjuvans vs. Malaria	n.a.
Wang 2013 <sup>17</sup>	V <sub>HH</sub> (Anti EGFR)	<i>H.s.</i>	<i>in vitro</i> Bindung	<i>E. coli</i> BL21

In den ersten Publikationen wurde die Assemblierung von Oktameren beobachtet,<sup>63; 65</sup> seit der Arbeit von Oudin *et al.* 2000 wird allgemein davon ausgegangen, dass bei der solitären Expression der  $\alpha$ -Kette exklusiv Heptamere gebildet werden. Trotzdem wird in Shinya *et al.* 2009 wieder eine Oktamerisierung beschrieben.<sup>67</sup> Möglicherweise ist die Beobachtung von Oktameren auf die verwendeten Expressionssysteme bzw. Analysemethoden zurückzuführen. Im Folgenden werden einige der in Tabelle 2 aufgeführten Publikationen näher vorgestellt (grau hinterlegt).

In der Veröffentlichung von Libyh *et al.* wurde die C-terminale Oligomerisierungsdomäne der humanen C4BP  $\alpha$ -Kette erstmals als potentiell Grundgerüst zur Oligomerisierung von

---

Wirkstoffen aufgeführt. In der Arbeit aus dem Jahr 1997 wurde die Oligomerisierungsdomäne rekombinant mit dem scFv Anti-Rh(D) Antikörperfragment fusioniert.<sup>63</sup> Der Anti-Rh(R) Antikörper wird zur Vermeidung einer Rhesus-Inkompatibilität zwischen einer Rh<sup>-</sup> Mutter und ihrem Rh<sup>+</sup> Fetus verwendet. Der applizierte Antikörper markiert Rh<sup>+</sup> Erythrozyten des Fetus und sorgt für einen raschen Abbau, bevor es zu einer Sensibilisierung und Produktion eigener Antikörper seitens der Mutter kommt. Die Produktion erfolgte in CHO Zellen, bei der anschließenden Analyse *via* SDS-PAGE wurde ein Gemisch von Hexa-, Hepta- und Oktameren beobachtet. Durch Vereinzelung der Zellen wurde ein Klon identifiziert der exklusiv Oktamere sezerniert und für die weiteren Experimente verwendet. Mit *in vitro* Assays wurde die Funktionalität des Konstrukts durch die Agglutination von Erythrozyten verifiziert. Eine immunogene Wirkung des Fusionsproteins wurde nicht nachgewiesen und die gesteigerte Agglutination auf die erfolgreiche Oligomerisierung zurückgeführt. In einem Nebensatz wurde in dieser Publikation bereits eine erhöhte Stabilität angedeutet. Nach einer Lagerung für 2 Jahre bei 4 °C bzw. der einmonatigen Inkubation bei 37 °C war kein Aktivitätsverlust des Fusionsproteins feststellbar.

Ein Jahr später wurde das Produktionssystem von Oudin und Libyh *et al.* verwendet, um die Produktion von Heterooligomeren auf Basis der C4BP-Oligomerisierungsdomäne zu untersuchen.<sup>66</sup> In dem verwendeten *in vitro* Modell sollte die Bispezifität mit der Bindung bzw. dem Abtransport von Immunkomplexen durch CR1-Deposition auf CR1-defizienten Erythrozyten nachgewiesen werden. CR1 fungiert als Kofaktor von Faktor I beim Abbau von C3b und C4b auf endogenen Zelloberflächen und attenuiert die Komplementaktivierung, ein Rückgang der CR1 Abundanz wird mit dem Verlauf diverser Krankheiten assoziiert. Zunächst wurde ein CR1-C4BP $\alpha$  Oligomer erzeugt und charakterisiert. Mit *in vitro* Assays wurde die spezifische Bindung an C3b-opsonierte Erythrozyten und darauffolgende Inhibition der Komplementkaskade gezeigt. Ziel dieser Arbeit war allerdings die gezielte Deposition von CR1 Rezeptoren auf CR1 defizienten Erythrozyten. Die Sekretion von stochastisch verteilten Heterooligomeren wurde hierbei durch die Kotransfektion von CHO Zellen mit scFV Anti-Rh(D)-C4BP $\alpha$  und CR1-C4BP $\alpha$  erreicht. Die Bispezifität der Proteine wurde mittels SPR und FACS verifiziert. Die Funktionalität wurde des Weiteren mit einem *in vitro* Assay bestätigt, hierzu wurden Erythrozyten mit Papain behandelt um einerseits CR1 von der Oberfläche zu entfernen und andererseits um die Rh(D) Epitope freizulegen. Radioaktiv markierte Immunkomplexe wurden daraufhin über die gebundenen CR1/ scFV Anti-Rh(D) C4BP Heterooligomere an den Erythrozyten nachgewiesen.

Von Dervillez *et al.* wurde die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des C4BP als Grundgerüst zur Herstellung eines HIV-Therapeutikums eingesetzt.<sup>56</sup> C46 ist ein antivirales Medikament zur

---

Behandlung der HIV-Infektion.<sup>71</sup> Das Peptid wurde aus den Sequenzen der beiden HIV-Therapeutika T20 und T1249 entwickelt.<sup>72; 73</sup> Diese Peptide binden das Transmembranprotein gp41 von HIV-1 und verhindern dadurch als Fusionsinhibitoren eine Verschmelzung des HIV-Virus mit der Wirtszelle.<sup>74</sup> Ihr Nachteil ist die geringe Größe und die damit geringe *in vivo* Halbwertszeit. T20 beispielsweise muss, um seine antivirale Wirkung entfalten zu können, zweimal am Tag zu 100 mg verabreicht werden.<sup>75</sup> Von Dervillez *et al.* wurden Fusionsproteine unterschiedlicher Valenz (Mono-, Di- bzw. Heptamer) von C46 und der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP $\alpha$  in HEK Zellen hergestellt und auf ihre antivirale Wirkung untersucht. Monomere bzw. Dimere wurden durch den Austausch eines bzw. beider Cysteinreste nach Glycin realisiert. *In vitro* konnte mit zunehmender Oligomerisierung ebenfalls eine zunehmende Persistenz in Mäuse- bzw. Rattenplasma beobachtet werden. *In vivo* liegt das kritische Molekulargewicht (MW) eines Medikaments zwischen 20 - 40 kDa, da dies der Ausschlussgrenze der Nieren entspricht.<sup>56</sup> Im Mausmodell konnte zwar keine erhöhte antivirale Aktivität der Konstrukte nachgewiesen werden, jedoch konnte aufgrund der erhöhten Serumstabilität eine verbesserte Verteilung beobachtet werden. Das in dieser Publikation verwendete Plasmid pEF-IRESp wurde freundlicherweise von Dr. Ursula Dietrich (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) für die vorliegende Dissertation zur Verfügung gestellt.

Der Einsatz von Adjuvantien bei einer Immunisierung ist oft erforderlich, da gereinigte Antigene häufig nur schwach immunogen sind oder aufgrund ihrer relativ geringen Größe nur eine geringe Serumstabilität/ Halbwertszeit aufweisen. Das Oberflächenprotein MSP1<sub>19</sub> (19 kDa) des Merozoits aus dem Lebenszyklus von *Plasmodium yoelii* ist ein schwaches Antigen.<sup>76</sup> In Kombination mit Freund's Adjuvans wurden mit diesem Antigen Nachtaffen (*Aotus*) erfolgreich gegen Malaria geimpft, sechs für den Menschen zugelassene Adjuvantien führten hierbei jedoch nicht zu einem Impfschutz.<sup>77</sup> In der Arbeit von Ogun *et al.* wurde die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des Maus C4BP $\alpha$  (mC4BP $\alpha$ ) als Adjuvans bei der Immunisierung von BALB/c Mäusen gegen Malaria untersucht.<sup>59</sup> Zu diesem Zweck wurde MSP1<sub>19</sub> an die C-terminale Oligomerisierungsdomänen von mC4BP $\alpha$  fusioniert und in *E. coli* produziert. Mit MSP1<sub>19</sub>-mC4BP $\alpha$  geimpfte Mäuse waren in der Lage, eine normalerweise letale Dosis von Parasiten zu überleben. Das Fusionsprotein mit der mC4BP $\alpha$ -Oligomerisierungsdomäne induzierte allerdings ebenfalls eine Immunantwort gegen das nativ zirkulierende C4BP des murinen Komplementsystems. Bisher wurde davon ausgegangen, dass das endogene Grundgerüst nicht als Fremdkörper identifiziert wird.<sup>63; 66</sup> Möglicherweise wurden aufgrund des bakteriellen Produktionssystems und des daraus resultierenden Fehlens jeglicher Glykosylierung Epitope freigelegt, die in den vorangegangenen Arbeiten verborgen geblieben sind. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen wurden Fusionsproteine mit homologen Oligomerisierungsdomänen

---

(*G. gallus*, *H. sapiens* usw.) hergestellt und *in vivo* im Mausmodell überprüft. Diese Experimente führten sukzessive zu einer C-terminal verkürzten (-7 AS) Chimäre aus zwei *G. gallus* C4BP $\alpha$ -Oligomerisierungsdomänen (IMX313). Interessanterweise wurden durch die Verwendung von MSP1<sub>19</sub>-IMX313 höhere Antikörpertiter gegen MSP1<sub>19</sub> aber nicht gegen die Oligomerisierungsdomäne des endogenen C4BP induziert. In dieser Publikation wurde ebenfalls gezeigt, dass die C4BP-Oligomerisierungsdomänen nicht wie ein klassisches Adjuvans funktioniert, sondern nur einen immunstimulierenden Effekt hat, wenn Antigen und Oligomerisierungsdomäne assoziiert vorliegen. Aufgrund signifikanter Unterschiede in den beobachteten Antikörpertitern der untersuchten Oligomerisierungsdomänen (alles Heptamere) gehen die Autoren davon aus, dass neben Aviditätseffekten noch andere Mechanismen für die verbesserte Immunantwort verantwortlich sein müssen, ggf. das Vorhandensein von T-Zell-Epitopen. IMX313 wird von der Firma IMAXIO vermarktet, laut Firmenhomepage (<http://www.imaxio.com/>) befinden sich mehrere auf IMX313 basierende Vakzine (Malaria, *S. aureus*, Influenza) in präklinischen Studien.

In der Publikation von Spencer *et al.* 2012 wurde diese Fragestellung in zwei präklinischen Modellsystemen untersucht (Maus und Rhesusmakaken).<sup>68</sup> Hierzu wurde an die Oligomerisierungsdomäne IMX313 das *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85A fusioniert. Dieses Antigen war oder ist ein Hoffnungsträger bei der Entwicklung eines verbesserten Impfschutzes gegen Tuberkulose, wobei jüngste Ergebnisse einer Phase 2b Studie des MVA-85A Vakzins allerdings für Ernüchterung gesorgt haben.<sup>78; 79</sup> In Spencer *et al.* wurden Varianten des modifizierten Vaccinia Ankara Virus (MVA) in CEF-Zellen amplifiziert, gereinigt und in den beiden Modellsystemen untersucht. Hierbei konnte mit dem MVA-85A-IMX313 Oligomer im Vergleich zu dem MVA-85A Monomer nach relativ kurzer Zeit (3 Tage) eine doppelt so hohe Häufigkeit antigenspezifischer T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) beobachtet werden. Die gesteigerte Immunantwort scheint ihren Ursprung nicht in einer erhöhten Teilungsrate der T-Zellen zu haben, sondern in deren frühen Aktivierung. Dieser Effekt, vermuten die Autoren, liegt in der Erhöhung der effektiven *in vivo* Antigendosis begründet. Eine Oligomerisierung über die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des C4BP wurde ursprünglich für eine Verlängerung der Serumhalbwertszeit eingesetzt. Möglicherweise führt sie über Aviditätseffekte zu einer verbesserten Aufnahme der oligomerisierten Antigene durch APCs (*antigen presenting cells*). Außerdem könnte eine erschwerte Verarbeitung der Oligomere in den Lysosomen der APCs darüber hinaus zu einer Verlängerung der Antigenpräsentation beitragen.<sup>80</sup> In der Publikation von Forbes *et al.* aus demselben Jahr wurde spekuliert, ob eine mit Antigenen funktionalisierte Oligomerisierungsdomäne noch in der Lage ist, mit C-reaktivem Protein bzw. Serum Amyloid P



---

zu interagieren.<sup>69</sup> Möglicherweise liegt die immunstimulierende Wirkung der Oligomerisierungsdomäne in der Interaktion mit diesen Pentraxinen begründet.

Die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b-Bindeproteins sowie ihr homologen und abgeleiteten Strukturen bieten somit ein vielseitiges Anwendungsspektrum. Funktionen wie eine erhöhte Serumstabilität, Avidität oder die Stimulation einer Immunantwort durch Fusion an diese Oligomerisierungsdomäne wurden bereits mehrfach belegt. Die hier zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

In den vorgestellten Publikationen wurden funktionalisierte C4BP-Varianten hauptsächlich in *E. coli* bzw. Zellkultur hergestellt. Eine Produktion in niederen Eukaryoten ist bis zum Erscheinen dieser Arbeit nicht beschrieben worden. Im folgenden Abschnitt wird ein eukaryotisches Expressionssystem in *Yarrowia lipolytica* vorgestellt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte dieser niedere Eukaryot für die Produktion von C4BP-basierenden Homo- bzw. Heterooligomeren evaluiert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst das Sekretionsvermögen dieser Hefe an drei in phylogenetischer Herkunft, Größe und Architektur sehr unterschiedlichen Proteinen untersucht.

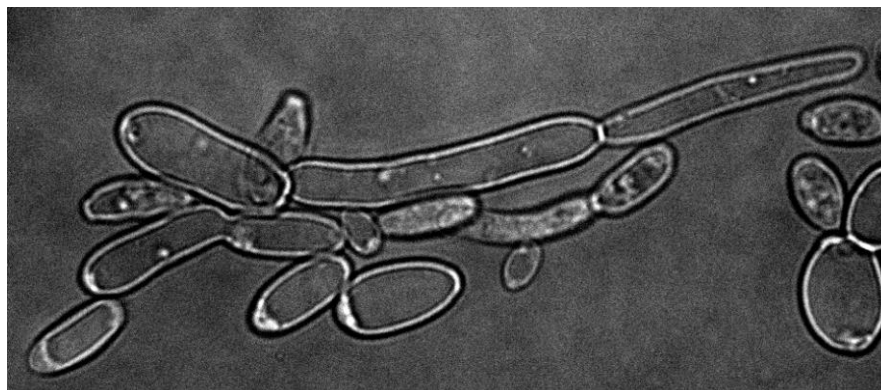


---

## 1.4 *Yarrowia lipolytica*

Die nicht-konventionelle Hefe *Yarrowia lipolytica* ist ein relativ junger Modellorganismus der Molekularbiologie. Aufgrund einiger Besonderheiten birgt dieser Organismus allerdings ein vielversprechendes Potential, was sich in der stetig steigenden Anzahl jährlich veröffentlichter Publikationen widerspiegelt.<sup>81</sup> In dieser Arbeit wurde die Hefe in Bezug auf ihr Potential zur heterologen Proteinproduktion untersucht. Mit diesen Experimenten sollte abgeschätzt werden, ob sie sich ggf. als Produktionssystem für komplexe Cystin-haltige Proteine eignet, zu denen auch das C4BP gehört. Im Folgenden wird die Hefe *Y. lipolytica* zunächst vorgestellt und im Kontext zu anderen Hefen eingeordnet, bevor der aktuelle Stand der Technik erläutert wird.

Der Gattungsname *Yarrowia* wurde 1980 in Anerkennung an David Yarrow eingeführt.<sup>82; 83</sup> Zuvor wurde diese Hefe bereits in verschiedenen andere Gattungen eingeordnet: *Candida*, *Endomycopsis* oder *Saccharomycopsis*. Unvereinbarkeiten wie beispielsweise der positive Befund im Urease-Test, ein vergleichsweise hoher GC-Gehalt (49,5-50,2%) sowie das Vorhandensein von Galaktose in der Zuckerzusammensetzung der Hefezelle führten letztendlich zur Einführung der neuen Gattung *Yarrowia*.<sup>82; 84; 85</sup> Der Speziesname *lipolytica* beschreibt die sehr effiziente Fähigkeit dieser Hefe zur Hydrolyse von Lipiden. *Yarrowia lipolytica* ist in der Lage, ein breites Spektrum an hydrophoben Substraten als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Alkane, Fettsäuren und Öle). Daher findet man sie beispielsweise auf lipid- und proteinhaltigen Nahrungsmitteln aber auch im Erdboden, Abwasser oder ölverschmutztem Erdreich.<sup>86</sup> Des Weiteren wurde *Yarrowia* ebenfalls in marinen und hypersalinen Habitaten isoliert.<sup>87</sup> Die Anpassung an die Umsetzung hydrophober Substrate kann zu einer Akkumulation von Lipiden von bis zu 40% der Trockenzellmasse führen, aus diesem Grund wird *Yarrowia* auch zur Gruppe der ölhaltige Hefen gezählt.<sup>88</sup> Die beiden Kreuzungstypen werden MATA und MATB genannt, *Y. lipolytica* ist obligat aerob und in der Regel bei Temperaturen über 32 °C nicht mehr lebensfähig. Als dimorpher Pilz kommt sie unter normalen Kulturbedingungen (YPD) in einer Mischung aus Hefezellen und kurzen Myzelien vor (Abb. 4). Die Sauerstoffkonzentration, pH-Wert sowie Kohlenstoff und Stickstoffquelle beeinflussen hierbei die Morphologie.<sup>89</sup>



**Abb. 4:** Mikroskopische Aufnahme der nicht-konventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica*. Beide Formen der dimorphen Hefe sind zu erkennen.

Traditionell wird *Y. lipolytica* in die Gruppe der nicht-konventionellen Hefen eingeordnet.<sup>90</sup> In dieser Gruppe werden praktisch alle Hefen zusammengefasst, die nicht mit den beiden etablierten Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* assoziiert sind. Andere nicht-konventionelle Hefen sind z.B. *Kluyveromyces lactis* und *Pichia pastoris*. 2004 erfolgte die Sequenzierung des Genoms von *Yarrowia lipolytica* und unterstrich ihre phylogenetische Sonderstellung. *Y. lipolytica* hat sich demnach durch mehrere evolutive Ereignisse von *S. cerevisiae* aber auch von anderen nicht-konventionellen Hefen entfernt.<sup>91</sup> Durch das stetige Interesse an diesem Organismus hat sich *Y. lipolytica* in den vergangenen Jahrzehnten zu einem Modellorganismus mit vielseitigen Einsatzmöglichkeiten in der Grundlagenforschung entwickelt und Verwendung in unterschiedlichen molekularbiologischen und industriellen Anwendungen gefunden.<sup>81</sup> Die nicht pathogene Hefe hat für diverse industrielle Herstellungsprozesse wie die Produktion von Futtermittel (Einzellerprotein), Zitronensäure und  $\gamma$ -Decalacton (Pfirsicharoma) den GRAS Status erhalten (*generally regarded as safe*).<sup>88</sup>

Im Vergleich zu anderen Hefen verfügt *Yarrowia lipolytica* über ein sehr leistungsfähiges System zur Proteinsekretion.<sup>92</sup> Je nach Umgebung werden zum Teil große Mengen endogener Enzyme sekretiert, bspw. alkalische oder saure Protease (AEP/ AXP), Lipasen, RNase oder Phosphatase.<sup>86</sup> Das XPR2 Gen codiert hierbei für die AEP, das mit 1 – 2 g/L am stärksten sekretierte *Yarrowia* Protein.<sup>93</sup> Trotz eher komplexer Induktion (pH über 5,5, Kohlenstoff- und Stickstoffmangel, volle Induktion erst bei hohen Pepton Konzentrationen) wurde dessen Promotor (*pXPR2*) in den 90er Jahren für die heterologe Proteinproduktion in *Yarrowia* verwendet. Beispielsweise wurde mit dem AEP Promotor und dessen Signalsequenz die Sucrose-Invertase (SUC2) aus *S. cerevisiae* in *Y. lipolytica* produziert.<sup>94</sup> Aus diesen Experimenten resultierte die Etablierung von SUC2 als

Selektionsmarker, da *Yarrowia* normalerweise Sucrose nicht als einzige Kohlenstoffquelle nutzen kann.

Die nähere Untersuchung der *pXPR2* Region offenbarte *upstream activator sequences* (UAS) und führte in Kombination mit dem eher schwachen *LEU2* Promotor (*pLEU2*) zu sehr starken quasi konstitutiven synthetischen Promotoren wie zum Beispiel dem Hybridpromotor hp4d.<sup>95</sup> In Folgearbeiten wurde der Einfluss von UAS-Wiederholungen auf die Stärke der Hybridpromotoren erkannt und weiterentwickelt. Aus den Kernbereichen der hp4d und TEF Promotoren (*Translation elongation factor EF-1 $\alpha$* ) und unterschiedlich vielen Wiederholungen von UAS1B Sequenzen wurde eine ganze Reihe verschieden starker Promotoren erstellt, unter denen sich auch der stärkste bis jetzt beschriebene *Y. lipolytica* Promotor befindet.<sup>96</sup>

Mit der Entwicklung von stabilen genetischen Markern und der Etablierung von molekularbiologischen Arbeitsmethoden wurden auch für die heterologe Proteinproduktion optimierte *Yarrowia*-Stämme etabliert.<sup>97; 98</sup> Bereits Mitte der 90er wurden erste AEP<sup>-</sup> Stämme erzeugt. Etwa fünf Jahre später wurde mit Po1f ein Stamm hergestellt, der keine endogenen extrazellulären Proteasen (AEP<sup>-</sup> und AXP<sup>-</sup>) mehr sekretiert.<sup>95</sup> Sehr viel Pionierarbeit bei der Erforschung und Optimierung der Proteinproduktion wurde mit den endogenen Lipasen und hier vor allem der Lipase Lip2 geleistet.<sup>99; 100</sup> Mit chemischer- und UV-Mutagenese sowie durch Mehrfachintegration von Lip2 Kopien in das Genom von *Yarrowia* wurde die Sekretion der Lipase gesteigert.<sup>101-104</sup>

Als Resultat all dieser Fortschritte wurden in den vergangenen 2 Jahrzehnten Dutzende sehr unterschiedliche Proteine mit zum Teil industriellem Anwendungspotential heterolog in *Yarrowia* produziert: Endo- $\beta$ -1,4-Mannanase (*Aspergillus aculeatus*);<sup>105</sup>  $\alpha$ -Amylase (*Oryza sativa*);<sup>106</sup> sechs verschiedene Hydrolasen (versch. Pilze);<sup>92</sup> FXIIIa (*H. sapiens*)<sup>107</sup> um nur einige zu nennen.

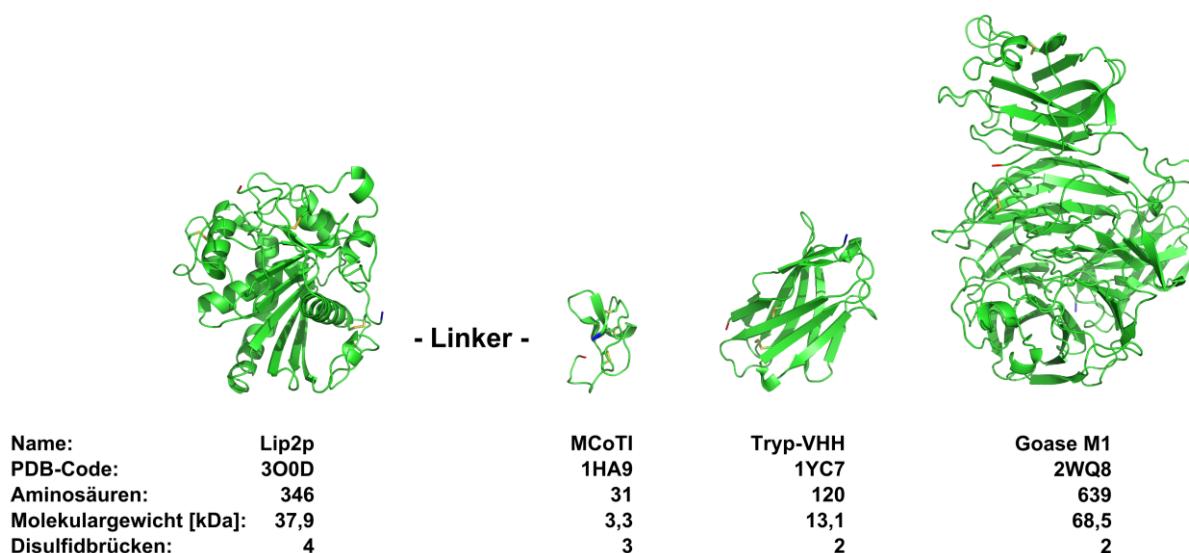
Zurzeit werden Bestrebungen unternommen, Stämme mit einem humanisierten Glycosylierungsmuster zu erzeugen. In ersten Experimenten wurde bereits das humane Enzym Glucocerebrosidase entweder mit einem homogenen Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> oder Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> Glycosylierungsmuster produziert.<sup>108</sup> Dieses Enzym wird seit 1994 von Genzyme (Sanofi) in CHO Zellen hergestellt und unter dem Namen Cerezyme zur Behandlung der seltenen Gaucher-Krankheit vertrieben.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass mittlerweile eine ganze Reihe von unterschiedlichen *Yarrowia* Stämmen und Plasmiden für die heterologe Proteinproduktion zur Verfügung steht. Mit dem YLEX Expression Kit (Yeastern biotech co., Ltd) ist seit einigen Jahren bereits ein kommerziell erhältliches *Y. lipolytica* Expressionssystem auf dem Markt. Durch das

stetige Interesse an der nicht-konventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica* hat sich diese in den letzten Jahren von einem vielversprechenden Sonderling zu einem vielseitigen Modellorganismus entwickelt.

## 1.5 Lip2p Fusionspartner

Ziel der Experimente war die Untersuchung der Ausbeuten und biologischen Aktivitäten der drei Modellproteine MCoTI, Tryp-VHH und Goase M1 als Lip2p Fusionsproteine in der Hefe *Y. lipolytica*. Die Lipase Lip2p sowie die drei Fusionsproteine sind in Abb. 5 im selben Maßstab dargestellt. Im Folgenden werden die untersuchten Fusionsproteine vorgestellt.



**Abb. 5:** Überblick der mit *Y. lipolytica* als Lip2p Fusion produzierten Proteine: MCoTI, Tryp-VHH und Goase M1. Unter der jeweiligen Kristallstruktur sind Name, PDB ID, Anzahl der AS, Molekulargewicht sowie die Anzahl der Disulfidbrücken aufgeführt. Der Abstandhalter zwischen Lip2p und den Zielproteinen besteht aus einem 6His-Epitop, Hexapeptid Abstandhalter und einer TEV-Protease-Erkennungsstelle (Aminosäureabfolge des Linkers, die *TEV-site* ist unterstrichen, Position P1' ist durch einen Bindestrich abgetrennt: GHHHHHHMDSPDLENLYFQ-S). Die N-Termini sind in Rot, die C-Termini in Blau und die Disulfidbrücken in Gelb hervorgehoben. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013b<sup>109</sup>)

Das Miniprotein MCoTI ist ein Vertreter einer großen Familie von Trypsin Inhibitoren aus Kürbisgewächsen.<sup>110; 111</sup> Diese Peptide bestehen üblicherweise aus ca. 30 Aminosäuren, sind zyklisch oder offenkettig und besitzen eine konservierte Disulfidbrückenverknüpfung, die auch als Pseudoknotenmotiv bekannt ist.<sup>112</sup> Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Stabilität, Verfügbarkeit, chemisch und rekombinant sowie einer hohen Toleranz gegenüber Sequenzveränderungen hat sich diese Gruppe von Molekülen zu einer wertvollen Quelle von Grundgerüsten für die Pharma- und Wirkstoffforschung entwickelt.<sup>113; 114</sup> Die hier verwendete

---

Variante stammt aus einer von Bernhard Glotzbach durchgeführten Bibliotheksdurchmusterung.<sup>115</sup>

Bei dem zweiten Zielprotein, dem Tryp-VHH (*Trypanosoma binding- variable heavy chain of a heavy chain antibody*) handelt es sich um ein gut charakterisiertes Antikörperfragment.<sup>116</sup> Diese schwere Kette eines Kameliden-Antikörpers erreicht aufgrund ihrer relativ geringen Größe konservierte Kohlenhydrat-Epitope an der Basis der VSGs (*variant surface glycoprotein*) von Trypanosomen. Diese Gruppe von Antikörperfragmenten zeichnet sich durch eine vergleichsweise geringe Größe bei gleichzeitig guten Bindeeigenschaften,<sup>117; 118</sup> Löslichkeit und Thermostabilität aus.<sup>119</sup> Diese Eigenschaften machen die Klasse der VHHs ebenfalls zu vielversprechenden Werkzeugen in der modernen Molekularbiologie.<sup>120; 121</sup>

Goase ist ein glykosyliertes Protein, welches die Oxidation diverser primärer Alkohole zu Aldehyden katalysiert. Im aktiven Zentrum enthält das Enzym Kupfer (II) und wird von diversen Pilzen sekretiert.<sup>122-125</sup> Das Enzym Goase hat viele biotechnologische Anwendungen gefunden, beispielsweise als Biosensor,<sup>126; 127</sup> in der chemischen Synthese<sup>128</sup> und in der Diagnostik.<sup>129-131</sup>

Diese Proteine wurden aus mehreren Gründen zur Evaluation des *Yarrowia lipolytica* Expressionssystems ausgewählt. Zum einen sind alle drei Vertreter von interessanten Proteinklassen für die noch keine Produktion in diesem Expressionssystem beschrieben wurde. Des Weiteren decken sie in Kombination ein Molekulargewicht zwischen 3,3 kDa und 68,5 kDa ab, bei einer annähernd konstanten Anzahl von 2 bis 3 Disulfidbrücken. Darüber hinaus kann die korrekte Faltung von allen mit individuellen Assays überprüft werden. Assays, in denen jeglicher Aktivität, egal ob Inhibition, Bindung oder Enzymaktivität, eine korrekte Faltung und Disulfidverbrückung vorausgeht.

---

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau und die Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von homo- und heterooligomeren Proteinkomplexen auf der strukturellen Grundlage der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b-Bindeproteins. Außerdem soll die Möglichkeit zur chemischen und rekombinanten Funktionalisierung der Oligomerisierungsdomäne experimentell untersucht werden, um eine Alternative bzw. Erweiterung zu bereits etablierten Konjugations- und Oligomerisierungsmethoden darzustellen. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit gliedert sich wie folgt:

- I. Auflösung der Kristallstruktur der hC4BP Oligomerisierungsdomäne und Charakterisierung der Struktur.
- II. Aufbauend auf I soll eine Charakterisierung der Oligomerisierungsdomäne im Hinblick auf Stabilität und Toleranz gegenüber Modifikationen erfolgen.
- III. Evaluation eines Expressionssystems in der Hefe *Yarrowia lipolytica* als mögliche Quelle zur Synthese attraktiver Fusionspartner.

---

## 2 Material

---

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 *Escherichia coli*

**B834 (DE3)**<sup>132</sup> (Merck Millipore)

F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm met* (DE3)

**BL21 (DE3)** (life technologies)

F<sup>-</sup> *ompT hsdSB(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) gal dcm* (DE3)

**DH5α**<sup>133; 134</sup> (Invitrogen)

F<sup>-</sup> Φ80*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) *phoA supE44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1*

**Origami (DE3)**<sup>135</sup> (Merck Millipore)

Δ(*ara-leu*)7697 Δ*lacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsLF'*[*lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro*] (DE3)*gor522::Tn10 trxB* (Kan<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)

**Rosetta (DE3)** (Merck Millipore)

F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) pRARE (Cam<sup>R</sup>)

**SHuffle™ T7**<sup>136</sup> (NEB)

F<sup>'</sup> *lac, pro, lacIQ / Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ(phoA)PvuII phoR ahpC\* galE* (or U) *galK λatt::pNEB3-r1-cDsbC* (Spec<sup>R</sup>, *lacI<sup>q</sup>*) Δ*trxB rpsL150*(Str<sup>R</sup>) Δ*gor Δ(malF)3*

**Top10** (Invitrogen)

F<sup>-</sup> *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

**XL10-Gold** (Stratagene)

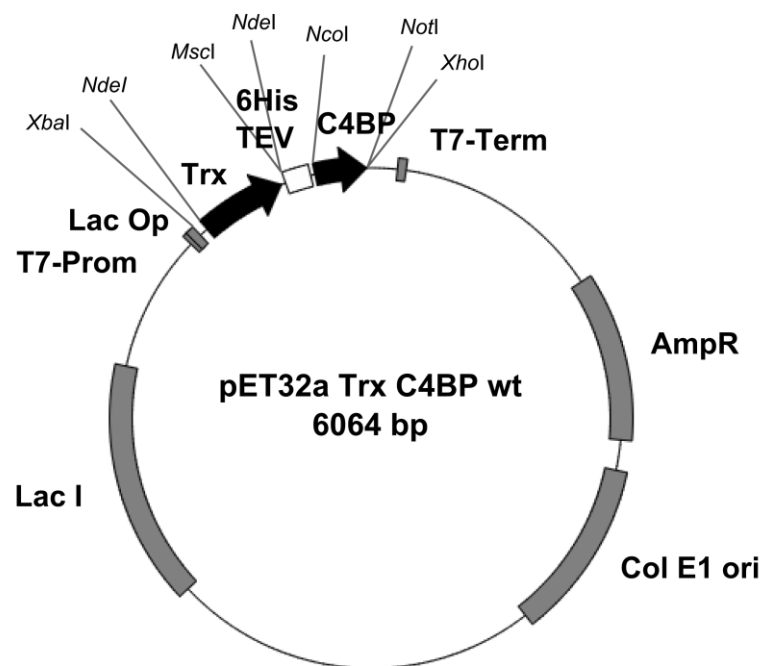
endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup>  
 F'[proAB lacI<sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cm<sup>R</sup>)]

**2.1.2** *Yarrowia lipolytica*

**Po1f**<sup>95; 137</sup>

*MatA*, *leu2-270*, *ura3-302*, *xpr2-322*, *axp-2*

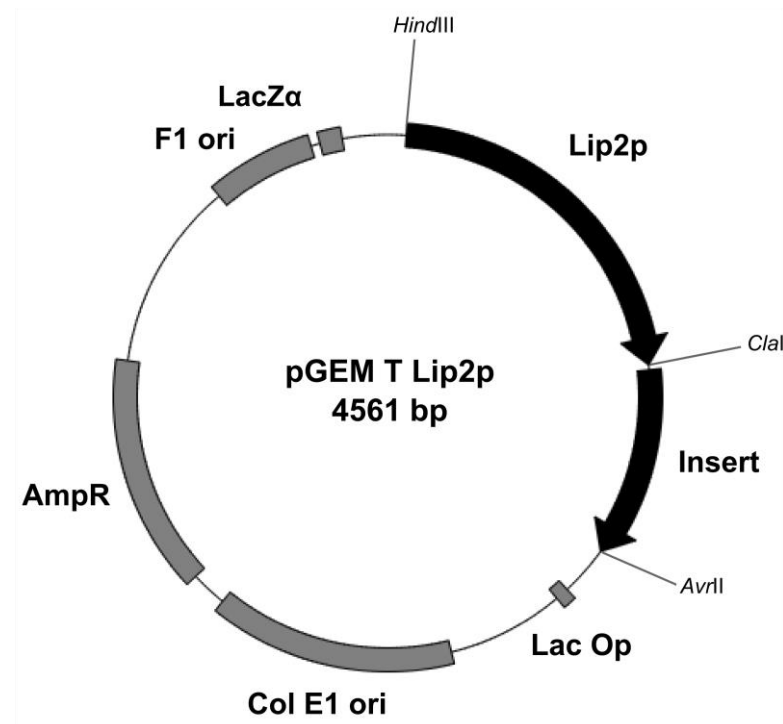
Phänotyp: Leu-, Ura-,  $\Delta$ AEP,  $\Delta$ AXP, Suc+; keine Sekretion von extrazellulären Proteasen

**2.2** Plasmide

**Abb. 6:** Genetische Karte des Plasmids pET32a Trx C4BP wt. Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente wird durch die Pfeilrichtungen angegeben. T7-Prom: T7-Promotor, Lac Op: Lac-Operon, Trx: Thioredoxin, 6His: Hexahistidin-Epitop, TEV: Erkennungssequenz der TEV-Protease (ENLYFQ-S), C4BP: C-terminale Oligomerisierungsdomäne der  $\alpha$ -Kette des humanen C4b-Bindeproteins (Aminosäuren: 540 - 597), AmpR:  $\beta$ -Laktamase kodierende Sequenz, Col E1 ori: Replikationsursprung, LacI: Lac-Repressor. Des Weiteren sind die Restriktionsschnittstellen der Enzyme: *XbaI*, *NdeI* (2x), *MscI*, *NcoI*, *NotI* und *XhoI* eingezeichnet.

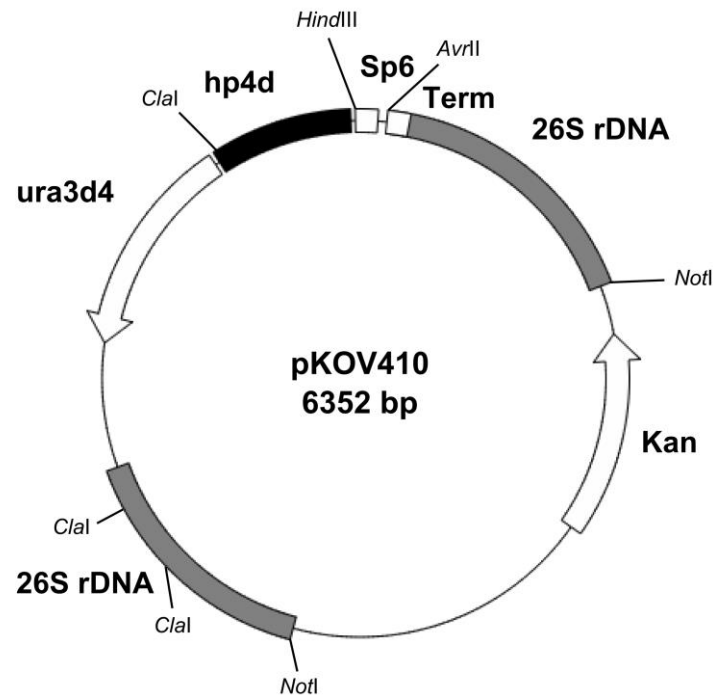
Derivate: Wt,  $\Delta$ Trx, 4x C-term verkürzte Varianten, 2x N-term verkürzte Varianten, M2A M6A, M2A M6A c50, E570Q, E577Q, E570Q E577Q, C4BP $\beta$  und C4BP $\beta$  191-261. Des Weiteren wurde mit der Plasmid Variante pET32a-Trx-FimF-turboGFP von Marc Jakuszeit gearbeitet.





**Abb. 7:** Der Subcloning Vektor pGEM T Lip2p wurde freundlicherweise vom Kooperationspartner aus Südafrika zur Verfügung gestellt und für die Klonierung der Lip2p-Fusionsproteine verwendet (siehe Derivate). Lip2p: codierende Sequenz der *Y. lipolytica* endogenen Lipase Lip2p, Insert: kodierende Sequenz eines synthetischen Konstrukts (Erythropoetin: 534 bp, diente hier lediglich als Platzhalter), Lac OP: Lac-Operon, Col E1 ori: Replikationsursprung, AmpR: codierende Sequenz des Ampicillinresistenz vermittelnden Enzyms  $\beta$ -Laktamase, F1 ori: Replikationsursprung des F1-Phagen, LacZ $\alpha$ : Fragment der  $\beta$ -Galactosidase. Des Weiteren sind die zur Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen: *HindIII*, *ClaI* und *AvrII* eingezeichnet.

Derivate: hAIDsc, Tryp-VHH, MCoTI, Goase M1



**Abb. 8:** Der Vektor pKOV410 dient der Integration von DNA Sequenzen in das Genom von *Yarrowia lipolytica*. Über die Schnittstellen *HindIII* und *AvrII* wurden in der vorliegenden Arbeit die Sequenzen der Lip2p Fusionsproteine in den Vektor eingebracht. Sp6: RNA Polymerase Promotorsequenz, Term: Transkriptionsterminator, 26S rDNA: DNA-Sequenz der großen ribosomalen Untereinheit für die Integration in das *Yarrowia* Genom, Kan: codierende Sequenz für das Kanamycin-Resistenz vermittelnde Enzym Neomycin Phosphotransferase II, ura3d4: mutiertes URA3 Allel erlaubt die Identifikation von multiplen Integrationen, hp4d: Hybridpromotor mit 4 UAS1B Kopien in direkter Orientierung. Vor der Integration wurde der Vektor mit *NotI* linearisiert. Das Plasmid pKOV410 wurde freundlicherweise von S. I. Bulani (CSIR, Pretoria, Südafrika) zur Verfügung gestellt.

Derivate: hAIDsc, Tryp-VHH, MCoTI, Goase M1

## 2.3 Oligodesoxyribonukleotide

**Tabelle 3:** In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Die Oligonukleotide sind nicht alphabetisch sondern projektbezogen gruppiert.

C4BPwt M2A M6A	
BglII TEV C4bp up	5'-GCGCGCAGATCTGGAAACCTGTACTTCCAGTCCGCCGGCGCGCACGCCGGGTG GGAGACCCCCGAAGGC-3'
C4bp XhoI lo	5'-GCGCGCCTCGAGTGCGGCCCAAGCTTGAATTCTTAGATTAGTTCTTTATC-3'
C4BPβ Oligomerisierungsdomäne solitär (rekursive PCR)	
C4bpB 1 up	5'-GGAAACTGATTAGGAGGCCCTAAACCGGAATGCGAGAAAGCGTTACTCGCC TTCCA-3'
C4bpB 2 lo	5'-CTGCATAAAGTTTCCATTGCTTCACAAAGATTCTTGACTCTTGAAGGCGAGT AAC-3'
C4bpB 3 up	5'-GAAAACTTTATGCAGCAGTTGAAAGAAAGCGGCATGACGATGGAAGAACTGA AGTATT-3'

---

C4bpB 4 lo	5'-TTACAGCAGTTTCGCTTTCAGTTCGGCTTCTTCAGTTCTAACGAATACTTCAGTTCTT-3'
------------	--

C4bpB 5 end up	5'-GCGCGCCCATGGGGAAACTGATTCAGG-3'
----------------	-----------------------------------

C4bpB 6 end lo	5'-GCGCGCCTCGAGTTACAGCAGTTTCGC-3'
----------------	-----------------------------------

---

**C4BPβ komplett: Oligomerisierungsdomäne mit 3 CCPs**


---

C4bpB Bgl II gene up	5'-GCGCGCAGATCTGAAAACTGTACTTCCAGTCCATGTTCTTCTGGTGTGCGTGTGT-3'
----------------------	---

C4bpB gene Xho I lo	5'-GCGCGCCTCGAGTTACAACAATTTTGC-3'
---------------------	-----------------------------------

---

**C-terminale Verkürzung von C4BPα Oligomerisierungsdomäne wt**


---

C4bp 54 lo	5'-GCGCGCCTCGAGTTAGTCTCTCTGTAGTTCCAG-3'
------------	---

C4bp 50 lo	5'-GCGCGCCTCGAGTTATTCCAGTTGTTCAATTC-3'
------------	--

C4bp 45 lo	5'-GCGCGCCTCGAGTTATTCCAGAGACAGCTTATA-3'
------------	---

C4bp 38 lo	5'-GCGCGCCTCGAGTTACTCCAGGGCCATTTTCAC-3'
------------	---

---

**N-terminale Verkürzung von C4BPΔC15**


---

TEV lo	5'-GGACTGGAAGTACAGGTTTTC-3'
--------	-----------------------------

el nativo up	5'-GAAAACTGTACTTCCAGTCCTGGGAGACCCCGAAGGC-3'
--------------	---

el gnomo up	5'-GAAAACTGTACTTCCAGTCCTGTGAACAAGTGCTCACAGG-3'
-------------	--

---

**Punktmutationen zur Untersuchung der internen stabilisierenden Ringe**


---

E570Q up	5'-CCCTGCAGGTATATAAGCTGTCTCTGGAAATTGAACAAC-3'
----------	---

E570Q lo	5'-GCTTATATACCTGCAGGG CCATTTTCACATCCTCTGGG-3'
----------	---

E577Q up	5'-CTGTCTCTGCAAATTGAACAAGTGGAACTACAGAGAGAC-3'
----------	---

E577Q lo	5'-GTTCAATTTGCAGAGACAGCTTATATACCTCCAGGGCC-3'
----------	--

E570Q E577Q lo	5'-GTTCAATTTGCAGAGACAGCTTATATACCTGCAGGGCC-3'
----------------	--

Trx AS 91-96 up	5'-AAAGTGGGTGCACTGTCT-3'
-----------------	--------------------------

---

**C4BPα Mutanten: Deletion/ Verschiebung von C14; Verlängerung von Helix H1 um eine Windung**


---

C4bp wt C14A up	5'-TGGGAGACCCCGAAGGCGCGGAACAAGTGCTCACAGGC-3'
-----------------	--

C4bp wt C14A lo	5'-GCCTGTGAGCACTTGTTCCGCGCCTTCGGGGGTCTCCCA-3'
-----------------	---

C4bp wt C14A V17C up	5'-TGGGAGACCCCGAAGGCGCGGAACAATGCCTCACAGGCAAAAGACTC-3'
----------------------	---

C4bp wt C14A V17C lo	5'-GAGTCTTTTGCCTGTGAGGCATTGTTCCGCGCCTTCGGGGGTCTCCCA-3'
----------------------	--

C4bp wt VLT xtend up	5'-CCCGAAGGCTGTGAACAAGTGTGACCGTGCTCACAGGCAAAAGACTC-3'
----------------------	---

C4bp wt VLT xtend lo	5'-GAGTCTTTTGCCTGTGAGCACGGTCAACACTTGTTTACAGCCTTCGGG-3'
----------------------	--

---

C4bp wt TAA XhoI lo	5'-GCGCGCCTCGAGTTAGATTAGTTCTTT-3'
<b>tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup></b>	
NcoI 6His tGFP up	5'-GCGCGCCCATGGGGCACCATCATCACCACCATATGGAATCTGATGAAAGC-3'
tGFP Int <sup>C</sup> Ex <sup>C</sup> HindIII lo	5'-GCGCGCAAGCTTACGCCAGCGAAATCAGAGAATCGCCAGAGATACAGCCAGAT TCTTTCTTTCTTCACCGGCATCTGC-3'
<b>Proteinproduktion in <i>Yarrowia lipolytica</i></b>	
hAID-Sc Gly up	5'-GCGCGCATCGATGGACACCATCACCACCACCACATGGACAGCCCAGATCTGGAA AACCTGTACTTCCAGTCCATGGACTCATTATTGATG-3'
pGEM-TLip hAID-Sc lo	5'-GCGCGCCCTAGGCTATTACAAACCCAAGGTTCTAAA-3'
Goase Gly up	5'-GCGCGCATCGATGGACACCATCACCACCACCACATGGACAGCCCAGATCTGGAA AACCTGTACTTCCAGTCCGCCTCCGCACCTATCGGT-3'
pGEM-TLip Goase lo	5'-GCGCGCCCTAGGCTATTACTGAGTAACGCGAATCGT-3'
MCoTI Gly up	5'-GCGCGCATCGATGGACACCATCACCACCACCACATGGACAGCCCAGATCTGGAA AACCTGTACTTCCAGTCTGGGGTGTTGCCCCGAAG-3'
pGEM-TLip MCoTI lo	5'-GCGCGCCCTAGGCTATTACGAGCCGCAGTAACCATT-3'
VHH-Tryp Gly up	5'-GCGCGCATCGATGGACACCATCACCACCACCACATGGACAGCCCAGATCTGGAA AACCTGTACTTCCAGTCCATGGGCGACGTTCAACTG-3'
pGEM-TLip VHH-Tryp lo	5'-GCGCGCCCTAGGCTATTAACCTGAAACTGTAACCTG-3'
<b>Sequenzieroligos</b>	
PagI Thrombin S-tag TEV up	5'-GCGCGCTCATGAGTGGTTCTGGCCATATGCACCA-3'
T7-Promoter up	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-Terminator lo	5'-TAGAGGCCCAAGGGGTTAT-3'
pJET up	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
pJET lo	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'
Lip2 Seq up	5'-AAGCTTTCCACCATCCTTTTCACAGCC-3'
Lip2 end Seq up	5'-TCTGCTCCAGCAGGTCAATG-3'
pKOV-F	5'-GTTTGCCAGCCACAGA-3'
pKOV-R	5'-CGATATTCATTTATTAAGTA-3'

---

## 2.4 DNA-Längenstandards & Protein-Molekulargewichtsmarker

Lambda DNA Eco47I (AvaII) Marker, 13 (Fermentas)

36 Fragmente (in bp): 8126, 6555, 6442, 3676, 2606, 2555, 2134, 2005, 1951, 1611, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 29, 23

O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)

11 Fragmente (in bp): 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10

O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)

10 Fragmente (in bp): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

1 kb DNA Ladder (NEB)

10 Fragmente (in kb): 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1 0,5

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

7 Fragmente (in kDa): 116 (Beta-Galactosidase, *E. coli*), 66,2 (Rinderserum-Albumin, Rinderserum), 45 (Ovalbumin, Hühnereiweiß), 35 (Lactat-Dehydrogenase, Schweinemuskel), 25 (RE Bsp98I, *E. coli*), 18,4 (Beta-Lactoglobulin, Kuhmilch), 14,4 (Lysozym, Hühnereiweiß)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

10 Fragmente (in kDa): 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10

Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa (NEB)

8 Fragmente (in kDa): 175, 80, 58, 46, 30, 25, 17, 7

## 2.5 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, Steinheim
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Int. Biotechnologies Inc. New Haven (USA)
Ampicillin-Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bacillol plus	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chill-out 14 Liquid Wax	MJ Research, Cambridge, MA (USA)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, Steinheim
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP Set	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol, 96%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid, ultra pure	MP Biomedicals, Carlsbad, CA, USA
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
High Resolution Agarose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Magnesiumchlorid	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma Aldrich Chem. GmbH, Steinheim
p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Salzsäure, mind. 37%, rauchend	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
L-Selenomethionin (SeMet)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, Steinheim
TRIS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Schill + Seilacher chem. Spezialitäten, Hamburg
Struktol J 673	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, Steinheim

## 2.6 Enzyme und Proteine

**Tabelle 4:** In der folgenden Tabelle sind die Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Proteine aufgelistet (Antikörper, Eichproteine, Polymerasen).

Enzyme und Proteine	Hersteller
Restriktionsendonukleasen, Taq DNA Polymerase, T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Restriktionsendonukleasen, Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim GmbH
<i>Gel Filtration Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit</i>	GE Healthcare (Little Chalfont, BUC, UK)
Taq Polymerase, Phusion Polymerase, TEV-Protease	<i>In house</i>
Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase Konjugat (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich GmbH (Steinheim)
Anti-Penta-His-Alexa-Fluor 488 Konjugat	Qiagen GmbH (Hilden)

## 2.7 Kits

**Tabelle 5:** In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Kits und ihre Hersteller aufgelistet.

Produkt	Hersteller
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	
<i>PureYield™ Plasmid Miniprep System</i>	Promega (Fitchburg, WI, USA)
<i>GoTaq® Hot Start Polymerase kit</i>	
<i>CloneJET™ PCR Cloning Kit</i>	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit</i>	
<i>Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit</i>	ZYMO RESEARCH (Irvine, CA, USA)

## 2.8 Lösungen und Puffer

Name	Inhaltsstoffe
Alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,0 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Ammoniumacetat-Stammlösung zur DNA - Fällung	7 M Ammoniumacetat in Wasser
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/mL Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, steril filtriert
Anodenpuffer BN-PAGE (10x)	0,5 M Bis-Tris pH 7
Anodenpuffer für SDS-PAGE nach Schagger	2 M Tris-HCl pH 8,9
APS-Stammlösung	10% (v/v) APS in Wasser
BCIP-Lösung	50 mg/mL BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidinsalz) in 70% (v/v) Dimethylformamid
Blocking-Puffer	3% (w/v) Milchpulver in PBS-Puffer
Chloramphenicol-Stammlösung	25 mg/mL Chloramphenicol in 96% (v/v) Ethanol
Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE	Lösung A: Coomassie R-250 0,7% (w/v) in Ethanol Lösung B: Essigsäure 20% (w/v)
dNTP-Mixtur (MBI Fermentas GmbH)	Je 10 mM dNTP (N = A, C, G, T) in Wasser
Ethidiumbromid-Stammlösung (10x)	10 mg/mL Ethidiumbromid in Wasser
Fermenter Base	1 M NaOH
Fermenter Säure	1 M HCl
Fermenter Antifoam	1:10 Struktol in H <sub>2</sub> O, vor Gebrauch autoklaviert



Name	Inhaltsstoffe
Hoechst-Puffer	8 M Harnstoff 200 mM Tris-Base 200 mM DTT 2% (w/v) SDS 0,15 mM Bromphenolblau
Hoechst-Puffer ohne DTT	(siehe Hoechst-Puffer)
IMAC-A Puffer	100mM NaCl 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 8,0
IMAC-B Puffer	IMAC-A-Puffer plus 1 M Imidazol pH 8,0
IPTG-Stammlösung	0,5 M bzw. 1 M IPTG in Wasser, steril filtriert
Kanamycin-Stammlösung	75 mg/mL Kanamycin in Wasser, steril filtriert
Kathodenpuffer BN-PAGE	50 mM Tricine 15 mM Bis-Tris pH 7 0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G
Kathodenpuffer für SDS-PAGE nach Schägger (10x)	1 M Tris-Base 1 M Tricine 1% SDS (w/v)
Lämmli-Puffer (Laufpuffer für die SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
NBT-Stammlösung	75 mg/mL NBT (Nitroblaue-Tetrazoliumchlorid) in 70% (v/v) Dimethylformamid
PBS-Puffer	140 mM NaCl 10 mM KCl 6,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4 mit NaOH bzw. HCl einstellen
PBS Tween-Puffer	PBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20
pNPP-Lösung	1 mg/mL in alkalische Phosphatase Reaktions-Puffer
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE	1,25 M Tris-HCl pH 6,8 10% SDS Stammlösung, 10% (w/v) SDS in $\text{H}_2\text{O}$
Sucrosefarbmarker	60% (w/v) Sucrose 0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1% (w/v) Xylencyanol FF in 1x TAE

Name	Inhaltsstoffe
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA
Taq 10x Puffer (MBI Fermentas GmbH)	100 mM Tris-HCl pH 8,8 500 mM KCl 0,8% (v/v) Nonidet P40
Tetrazyklin Stammlösung	10 µL/mL Tetrazyklin in 70% (w/v) Ethanol, bei -20 °C lagern
TEV-Protease Reaktionspuffer mit/ ohne EDTA (10x)	500 mM Tris-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl 5 mM EDTA
TFB1	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl 15% Glycerin, der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt und die Lösung mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert.
TFB2	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15% Glycerin, der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 6,5 eingestellt und die Lösung mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert
Trenngelpuffer für SDS-PAGE (Lämmli)	1,875 M Tris-HCl pH 8,8
Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit monodestilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt. Die verwendeten Kits (siehe Tabelle 5) wurden mit den mitgelieferten Puffern verwendet (siehe Herstellerangaben).

## 2.9 Nährmedien

Name	Inhaltsstoffe
dYT-Medium ( <i>double concentrated Yeast Tryptone medium</i> )	1% (w/v) Hefe-Extrakt 1,6% (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut 0,5% (w/v) NaCl
LB-Medium ( <i>Lysogeny Broth-Medium</i> )	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut 1% (w/v) NaCl
M9-Minimalmedium, Basismedium	1 gNH <sub>4</sub> Cl 3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O mit H <sub>2</sub> O auf 900 mL auffüllen und autoklavieren
M9-Minimalmedium, Supplement	22 g Glucose • H <sub>2</sub> O 0,61 g MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 11,2 mg Thiamin • HCl 10,4 mg Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> • H <sub>2</sub> O 50 mg SeMet mit H <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen, steril filtrieren und dem Basismedium hinzufügen
YNB-N <sub>5000</sub>	1,7 g/L <i>yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat 10 g/L Glucose 5 g/L Ammoniumsulfat (oder 6,7 g/L <i>yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren 10 g/L Glucose)
YNB-casamino Selektivplatten	0,17% <i>yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat 1% Glucose 0,1% casamino acids 0,1% Natriumglutamat

Die Nährmedien wurden vor Gebrauch zur Sterilisation 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar-Agar (Roth) zu den entsprechenden Medien gegeben. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren aus Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/L Chloramphenicol, 100 mg/L Ampicillin, 100 mg/L Tetrazyklin bzw. 75 mg/L Kanamycin zugegeben.

## 2.10 Sonstige Geräte

Hersteller	Gerät
Analytik Jena AG, Jena	Flex Cycler
American National Can., Chicago, USA	Parafilm "M" Laboratory Film
Bandelin electronic GmbH, Berlin	Sonoplus HD 2070
Bender & Hobein, Zürich, Schweiz	Vortex Genie 2
BioRad, München	Gene Pulser XCell Pulse Controller Elektroporationsküvetten Thermocycler 96CFX RT-PCR
Brand, Wertheim	PLASTIBRAND® UV-Küvetten
B. Braun Melsungen AG, Berlin	Einmalspritzen (2 mL, 20 mL, 30 mL, 50 mL)
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg	Mastercycler personal Centrifuge 5415 D Centrifuge 5415 R Bio Photometer Thermomixer compact
GE Healthcare Europe GmbH, München	<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i> <i>Elektrophoresis Power Supply</i> EPS 301 & 601 <i>2 ÄKTA FPLC purifier</i>
Gilson, USA	Mikroliter-Pipetten Pipetman, 1 mL, 200 µL & 20 µL
C. A. Greiner & Söhne, Nürtingen	Röhrchen 15 mL
Heidolph Instruments, Kehlheim	Polymax 2040 Magnetrührer MR 3000
Helma, Müllheim/Baden	Quarzküvetten (0,5 mL, 1,0 mm Schichtdicke)
Heraeus, Hanau	Multifuge 3L-R, Multifuge 1.0 Quarzglas-Bi-Destillationseinrichtung, Typ Destamat E 18, Kelvitron ® (Inkubator)
Herolab, Wiesloch	UVT2035 302 nm (UV-Leuchttisch)
Hettich Andreas GmbH & Co. KG Tuttlingen	TZ Mikroliter 15 k rpm
Hoefel Scientific, San Francisco, USA	Platten für SDS-Gele SE 250 Gelkammer

Hersteller	Gerät
IKA-Labortechnik, Staufen	beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT Schüttler VIBRAX-VXR KM02 Magnetrührer
Intas, Göttingen	Gel Jet Imager
Kimberley-Clark, USA	Kimwipes®Papiertücher
Knauer, Berlin	Präparative Pumpe K-1800
CEAG Schirp Reinraumtechnik, Essen	Sterilbank Envirco
Millipore, Eschborn	Filtereinheiten Millex FG13 Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage
Minolta, Langenhagen	Minolta X-700 Spiegelreflexkamera
Moulinex, Alençon, Frankreich	Mikrowelle Microchef FM 3510
Olaf Waase, Groß Schneen	Thermoblock V 4.0 Agarosegelkammer
Pharmacia Biotech, Freiburg	2117-250 Novoblot (Western Blot Transfer Apparat)
Roth, Karlsruhe	Rotiprotect Latex (Handschuhe) Visking® 20/32 (Dialyseschlauch) ZelluTrans (Dialyseschlauch)
Sarstedt, Nürnberg	Safe Seal Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2 mL Röhrchen 50 mL Petrischalen Pipettenspitzen PCR-Gefäße Multiply® µ-Strip 8er Kette
Sartorius, Göttingen	Biostat Bplus (Fermenter) Inkubationsschüttler Ceromat® BS-1 pH-Meter „Basic Meter“
SANYO E&E Europe BV, Biomedical Division, Loughborough, UK	VIP Series -86 °C Freezer
Schleicher und Schuell, Dassel	Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm) 3 MM-Filterpapier (Whatman)
Schott, Mainz	Glaswaren
Scotsman Ice Systems, IL, USA	AF 100 (Eismaschine)
Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan	UV 1650 PC UV-Visible Spectrophotometer RF 1501 Spectrofluorophotometer LC-MS 2020

Hersteller	Gerät
	Bio Spec Nano
Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz	Kühlzentrifuge 3K30 mit Rotor 12158 H
	Feinwaage AX200
SLM AMINCO® SLM INSTRUMENTS, INC, Schwäbisch Gmünd	<i>French® Pressure Cell Press</i>
Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz	ELISA-Reader GENios™
Terumo, Leuven, Belgien	UNIHOOD (Inkubator)
Wisd Laboratory Instruments, Wertheim	Inkubationsschüttler WiseCube®
Zirbus, Bad Grund	Autoklav HST 4-5-6

## 2.11 Datenverarbeitungsprogramme

Programm	Herkunft, Quelle
MS Office 2003/ 2010	Microsoft, Redmond, U.S.A.
Sigma Plot	Systat Software Inc., Chicago, Illinois. U.S.A.
FinchTV	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
PyMOL	Schrödinger, New York, U.S.A.
ApE- A plasmid editor	Davis, Salt Lake City, Utah, U.S.A.
Vector NTI ( <i>academic licence</i> )	Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.
Unicorn 4.00 und 5.31	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien
Inkscape	<a href="http://www.inkscape.org">www.inkscape.org</a>
Chem draw	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, U.S.A.
BioEdit	138
MultAlin	39
ESPrpt 2.2	40
Endnote X4	AdeptScience, Carlsbad, U.S.A.

---

## 3 Methoden

---

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Präparation der verwendeten Geräte und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden durch Autoklavieren für 20 min bei einer Temperatur von 121 °C sterilisiert. Hitzelabile Materialien wurden mit Bacillol plus (Roth), 70% Ethanol oder mittels Sterilfiltration (0,2 µm oder 0,45 µm) sterilisiert.

#### 3.1.2 Kultivierung von *E. coli*

Zur Anzucht der verwendeten *E. coli*-Stämme (2.1.1) wurde dYT, LB bzw. M9-Medium verwendet (2.9). Im Falle von einer oder mehrere Antibiotikaresistenzen wurde das Medium vor der Inokulation mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Kulturen bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

#### 3.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Kulturen

Die Kultivierung der entsprechenden Stämme erfolgte in einem Volumen von 50 mL wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 1. Bei Erreichen dieser optischen Dichte wurden die Zellen bei 4000 rpm für 12 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 mL Eiswasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 20 mL und 10 mL Eiswasser wiederholt. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet für einige Minuten auf Eis inkubiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden im Kondenswasser resuspendiert, aliquotiert und transformiert bzw. gelagert (siehe 3.1.4).

#### 3.1.4 Lagerung von *E. coli* Zellen

Elektrokompetente *E. coli* Kulturen wurden zur langfristigen Lagerung mit 10% DMSO (v/v) versetzt und als Gefrierkulturen bei -80 °C gelagert. Bereits transformierte bzw. häufig verwendete Klone wurden auf LB-Platten ausgestrichen, ü.N. bei 37 °C inkubiert und im Anschluss bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

#### 3.1.5 Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation von *E. coli* erfolgte standardmäßig mittels Elektroporationsmethode.<sup>139</sup> Hierzu wurden 1 µL Plasmidsuspension bzw. 5-10 µL ligierte Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA wurden mit 50 µL elektrokompetenten Zellen in die Elektroporationsküvette überführt. Die verwendeten Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm wurden zuvor gründlich mit

---

monodestilliertem Wasser ausgespült und auf Eis vorgekühlt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser II (BioRad) unter Verwendung der folgenden Spezifikationen: 200  $\Omega$ , 2,5 kV und 25  $\mu$ F. Unmittelbar nach dem Puls wurde 1 mL steriles dYT-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert und der Inhalt in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden zur Ausbildung der entsprechenden Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Verdünnungsausstrich auf Selektivplatten bzw. die Inokulation von komplettiertem Flüssigmedium.

### 3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Kulturen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurden 250 mL LB-Medium in einem 1 L Kolben mit den entsprechenden Zellen inokuliert und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,4-0,6 bei 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 4500 g für 5 min und 4 °C pelletiert und im Anschluss in einem viertel Volumen der Startkultur eiskaltem TFB1 Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit denselben Spezifikationen erneut pelletiert, in 10 mL TFB2 Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die chemisch kompetenten Zellen à 50  $\mu$ L aliquotiert, direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert.

### 3.1.7 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation hitzekompetenter *E. coli* Zellen wurde ein Aliquot mit kompetenten Zellen mit 50 ng Plasmid DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45°sec bei 42 °C gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen vorsichtig in einem Milliliter Vollmedium resuspendiert und für eine Stunde schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die gekurten Zellen wurden auf Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.8 Bestimmung der Zelldichte

Die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) einer Zellsuspension wurde mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Als Leerwert wurde unbeimpftes Medium verwendet. Die OD<sub>600</sub> Werte waren stets unter 1, ggf. musste hierzu die Zellsuspension verdünnt werden und die tatsächliche Zelldichte im Nachhinein berechnet werden.

### 3.1.9 Lagerung von *Y. lipolytica*

Hierzu wurden zunächst *Yarrowia lipolytica* Pof1 Zellen auf einer YPD-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 23 °C bis 35 °C inkubiert. Am Folgetag wurden mit einer Impföse etwa eine Öse voll



---

Zellen entnommen und in 1 mL YPD mit 25% Glycerol resuspendiert à 50 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.10 Transformation von *Y. lipolytica*

Für die Präparation kompetenter Zellen wurden zunächst aus einem Glycerol-Stock (3.1.9) *Yarrowia lipolytica* Po1f Zellen entnommen, auf einer YPD Platte ausgestrichen und ü.N. bei einer Temperatur zwischen 23 °C bis 25 °C inkubiert. Um die richtige Wachstumsphase der Zellen zu gewährleisten sollten die Platten am nächsten Tag eine flache, nur geringfügig texturierte Oberfläche zeigen. Mit einer Impföse wurden Zellen von der Übernachtskultur entnommen und in einem Reagiergefäß mit 1 mL TE Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mittels TZ bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen in 600 µL 0,1 M Lithiumacetat pH 6,0 (pH mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert und 1 h stehend bei 28 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen 2 min bei 3000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen vorsichtig in 80 – 120 µL Lithiumacetat-Puffer resuspendiert. Die hergestellte Menge kompetenter Zellen war ausreichend für bis zu drei Transformationen.

Die Integrationskassette wurde mit *NotI* aus dem Integrationsvektor pKOV410 geschnitten, eine weitere Reinigung bspw. mittels Extraktion aus einem Agarosegel (3.4.5) war an dieser Stelle möglich aber nicht nötig. Für die Transformation wurden 0,3 bis 0,5 µg Plasmid DNA in einem maximalen Volumen von 3 µL eingesetzt.

Für eine Transformation wurden 40 µL kompetente Zellen mit 2 µL *carrier* DNA (Clontech Ref. 630440 (10 mg/mL). Stammlösung aliquotiert à 1 mL, Lagerung bei 4 °C) und 3 µL der zu transformierenden DNA vermischt und 15 min bei 28 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 350 µL PEG 4000 (40% in Lithiumacetat 0,1 M pH 6,0 eingestellt mit 10%iger Essigsäure, Lagerung bei 4 °C) und 16 µL 1 M DTT (40 mM Endkonzentration) versetzt und 1 h stehend bei 28 °C inkubiert. Danach wurden 40 µL DMSO (10% Endkonzentration) zugegeben und die Hitzeschock-Transformation für 10 min bei 39 °C durchgeführt. Abschließend wurden 600 µL Lithiumacetat-Puffer zugegeben und die Suspension mit transformierten Zellen à 200 µL auf YNB-N<sub>5000</sub> Selektivplatten ausgestrichen und bei 28 °C inkubiert. Erste Kolonien waren nach 2 bis 3 Tagen zu erkennen.

### 3.1.11 Trypanosomen Bindungstest

Um die Bindungsaktivität des Tryp-VHH zu überprüfen wurde das Antikörperfragment zunächst von Christina Uth selektiv am N-terminalen Serin fluoreszenzmarkiert.<sup>140</sup> Hierzu wurden 1 mL gereinigtes Protein (1 mg/mL in 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) mit 100 µL Natriumperiodat (100 mM

in H<sub>2</sub>O) versetzt und bei RT unter Lichtausschluss 3 bis 4 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer äquimolaren Menge Ethylenglycol beendet und der Reaktionsansatz gegen 5 L PBS dialysiert. Die Kopplung von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid wurde in PBS pH 7,4 durchgeführt. Zu 0,5 mg (1 äq.,  $3,78 \times 10^{-8}$  mol) Tryp-VHH wurden 0,03 mg (2 äq.,  $7,56 \times 10^{-8}$  mol) Fluorophor gegeben und der Reaktionsansatz zunächst bei RT für 24 h unter Lichtausschluss inkubiert und im Anschluss wurde für 24 h gegen 5 L PBS dialysiert. Die Kopplung wurde mittels SDS-PAGE überprüft und das fluoreszenzmarkierte Antikörperfragment bei -80 °C gelagert.

Im darauf folgenden Zellbindungstest wurden der fluoreszenzmarkierte Tryp-VHH aus *Y. lipolytica* mit demselben in *E. coli* produzierten Protein verglichen.<sup>141</sup> Die Tests wurden von Michael Brecht in den Laboren der Arbeitsgruppe Göringer durchgeführt. Die beiden Antikörperfragmente wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen VSG präsentierenden *T. brucei* Blutstromformen vom Stamm Lister 427<sup>142</sup> inkubiert: MITat Serodem 1.2 exprimiert VSG 221 und MITat 1.4 exprimiert VSG 117. Die Parasiten wurden kultiviert nach Hirumi *et al.*<sup>143</sup> und bei einer Zelldichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/mL geerntet. Die Zellen wurden gewaschen und in PBS resuspendiert und jeweils mit 0,12 mg/mL der gereinigten und fluoreszenzmarkierten VHHs inkubiert. Die DNA der Trypanosomen wurde mit Höchst 33342 angefärbt. Als Negativkontrolle wurden Trypanosomen desselben Stammes (Lister 427) ohne VSGs (Insektenstadium) eingesetzt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde durchgeführt wie in Lorger *et al.* beschrieben.<sup>144</sup>

## 3.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden

### 3.2.1 Produktion von Thioredoxin-Fusionsproteinen in *E. coli*

Thioredoxine mit ihrem Dithiol/ Disulfid Motiv (CGPC) im aktiven Zentrum gehören zu den wichtigsten zellulären Disulfidbrücken-Reduktasen.<sup>145</sup> Die Thioredoxininfusion wurde daher verwendet, um bei der Produktion der cystinreichen C4BP Oligomerisierungsdomäne und deren Varianten eine lösliche Proteinproduktion zu gewährleisten.<sup>146</sup> Zusätzlich wurden die *E. coli* Stämme Origami (DE3) bzw. SHuffle™ T7 verwendet. Durch Mutation in den Genen der Thioredoxin Reduktase (*trxB*) und Glutathione Reduktase (*gor*) herrscht im Cytoplasma dieser Stämme ein weniger reduzierendes Milieu, was eine Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht. Im Fall von Shuffle™ T7 wird zusätzlich konstitutiv die Disulfidbrücken Isomerase C im Cytoplasma produziert.

### 3.2.2 Überprüfung der Expression ausgewählter Einzelklone

Bevor ein erzeugter Einzelklon zur Produktion im größeren Maßstab eingesetzt wurde, erfolgte eine nähere Untersuchung der Produktionsbedingungen. Mit dem sogenannten Expressionstest wurde versucht herauszufinden ob das gewünschte Protein produziert wird und welche Bedingungen hierfür zielführend sind.

Mit sterilen Pipettenspitzen/ Zahnstochern wurde ein Einzelklon von einer Selektivplatte abgenommen, auf einer Masterplatte ausgestrichen und zur Inokulation von jeweils 2 Röhrchen mit 5 mL dYT (mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert) verwendet. Die Masterplatte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und im Anschluss gelagert (3.1.4). Die Röhrchen wurden unter den entsprechenden Expressionsbedingungen (Variation von: IPTG Konzentration, Produktionsdauer, Temperatur bei Anzucht und Induktion usw.) im Schüttler inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte gemessen. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 wurde durch Zugabe von IPTG in eines der beiden Reagenzgläser die Produktion induziert und zumeist für 3 h aufrechterhalten. Das zweite Röhrchen diente als Kontrolle und wurde nicht induziert. Nach 3 h wurde von jedem Röhrchen mit der zuletzt gemessenen OD<sub>600</sub> das Äquivalent von 120 µL Zellsuspension einer OD<sub>600</sub> = 1 berechnet. Das entsprechende Volumen wurde abgenommen und für 2 min mit der Tischzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde in 20 µL PBS aufgenommen, mit 5 µL Hoechst Puffer versetzt und einer Gelelektrophorese unterzogen (3.2.6).

### 3.2.3 Expression im analytischen Maßstab

*E. coli*-Zellen wurden mit dem entsprechenden Vektor transformiert, 1 h bei 37 °C gekurt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden mit Einzelklonen 50 mL dYT-Medium (komplettiert mit den entsprechenden Antibiotika) als Vorkulturen angesetzt. Die Vorkulturen wurden bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde 1 L LB-Medium (komplettiert mit den entsprechenden Antibiotika) inokuliert und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD<sub>600</sub> gemessen. Beim Erreichen einer optischen Dichte von ca. 0,5 wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) die Proteinproduktion induziert. Die Expression wurde bei 25 °C unter Schütteln für 3 h durchgeführt.

Zur Ernte wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 6660 rpm für 13 min pelletiert und pro Liter Produktionsvolumen in 7,5 mL IMAC-A Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4 Proteinproduktion im Fermenter

Nach Optimierung der Expressionsbedingungen im Schüttelkolben wurden C4BP Varianten wie beispielsweise: Wildtyp und C4BP<sup>AC15</sup> im Fermenter produziert (Biostat B plus). Hierdurch konnten in relativ kurzer Zeit homogene Chargen mit Ausbeuten im dreistelligen Milligrammbereich erzielt werden.

Zur Vorbereitung wurde der Fermenter mit dem entsprechenden Volumen Medium gefüllt, komplett zusammengebaut (Thermometer, O<sub>2</sub>- und pH-Sonden, Prellbleche, Probennehmer und Rührwerk) und ü.N. autoklaviert. Am Folgetag wurde der Fermenter an die Steuereinheit angeschlossen, temperiert, mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert und aus einer Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 eingestellt. Die Bakterien wurden in der Regel bei einer Temperatur von 37 °C, 400 rpm, pH 7,0 und einer Begasung mit Hausdruckluft von 1 vvm kultiviert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 1 wurde die Expression durch automatische Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert. Die Expression wurde für ca. 4 h durchgeführt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension über den Probennehmer abgepumpt und sukzessive bei 4 °C und 13 k rpm für 13 min pelletiert. Die überschichteten Pellets wurde in 7,5 mL IMAC-A Puffer je Liter Produktionsvolumen resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5 Aufschluss durch *French-pressing*

Die Zellsuspension wurde üblicherweise aus dem -80er entnommen und bei ca. 37 °C im Wasserbad aufgetaut, was als *freeze-thaw* Zyklus und erster unvollständiger mechanischer Aufschluss betrachtet werden kann. Die Bombe der French-Press wurde mit der Probe befüllt, mit der Bodenplatte verschlossen und auf dem hydraulischen Hebetisch der French-Press arretiert. Über den Stempel wurde auf die Probe ein konstanter Druck von 1200 psig (ca. 80 bar) ausgeübt. Beim Verlassen der Bombe durch ein regulierbares Ventil erfolgte der Zellaufschluss durch Scherung und Dekompression.<sup>147</sup> Nach drei bis fünf Passagen durch die French-Press war ein annähernd 100%iger Aufschlussgrad erreicht, was mikroskopisch überprüft wurde.

### 3.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen und Proteingemischen erfolgte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese. Bei dieser Methode werden die Analyten entlang eines elektrischen Feldes durch eine netzartige Gelstruktur gezogen. Als Detergenz wurde hierbei Natriumdodecylsulfat verwendet (SDS). Dieses maskiert die Eigenladung der Proteine, da sich ca. 1,3 g SDS pro Gramm Protein anlagert und durch die anionischen Sulfatgruppen eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht erzeugt wird. In dieser Arbeit wurden

hauptsächlich SDS-PAGEs nach Schägger verwendet, diese erlauben eine Auftrennung von Proteinen mit relativ geringem MW (3-7,5 kDa). Dem verwendeten Auftragspuffer wurde neben Harnstoff ggf. noch Dithiothreitol (DTT) als denaturierende Substanz zugegeben, um Disulfidbrücken dauerhaft zu reduzieren (2.8).

In einer radikalischen Reaktion polymerisiert Acrylamid mit Bisacrylamid unter Luftausschluss zu chemisch inertem Polyacrylamidgel. Je nach Molekulargewicht des Proteins von Interesse wurden Trenngele mit verschieden hohem Vernetzungsgrad verwendet: Tris-Tricine-Gele nach Schägger mit 20% bzw. Lämmli-Gele mit 15% Acrylamid<sup>148; 149</sup>. Das Gieen und Polymerisieren der Gele erfolgte in einem Giestand, mit dem fünf bzw. zehn Gele gleichzeitig hergestellt werden konnten. Die Zusammensetzung von Sammel- bzw. Trenngel der beiden Methoden sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 angegeben.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele nach Schägger *et al.*, die angegebenen Volumina sind ausreichend für die Herstellung von 5 Gelen:

Lösung	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	20 mL	1,6 mL
3 M Tris/HCl, pH 8,45, 0,3% SDS	10 mL	3,1 mL
H <sub>2</sub> O monodest.	-	7,6 mL
APS-Stammlösung (10%)	100 L	100 L
TEMED	60 L	60 L

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele nach Lämmli, angegebene Volumina sind ausreichend für die Herstellung von 10 Gelen:

Lösung	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	45 mL (15%)	5,6 mL (6%)
1,875 M Tris/HCl, pH 8,8	18 mL	-
1,25 M Tris/HCl, pH 6,8	-	3,5 mL
SDS (10%)	900 L	350 L
H <sub>2</sub> O monodest.	25,8 mL	25,2 mL
APS-Stammlösung (10%)	200 L	200 L
TEMED	75 L	75 L

Nachdem die Glas- und Aluminiumoxidplatten sowie die Abstandhalter in den Giestand gespannt waren, wurde das Trenngel bis ca. 1 cm unter der Eintauchtiefe des Kamms eingefüllt.

---

Um eine Polymerisation unter Luftausschluss zu ermöglichen und um einen scharfen Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel zu erzeugen, wurde jedes einzelne Trenngel mit 1 mL 97% Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde der Isopropanol vollständig entfernt, das Sammelgel in die Apparatur gegossen und die Kämme in das Sammelgel eingetaucht. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurden die fertigen Gele in mit Wasser befeuchtete Papiertücher geschlagen, in einen Vernichtungsbeutel gepackt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Probenvorbereitung wurden die aufzutrennenden Lösungen mit 5-15 µl *Hoechst*- Puffer versetzt, 10 min bei 98 °C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Polyacrylamidgele wurden in die Laufkammer eingespannt und die Kammer mit dem entsprechenden Puffer befüllt. Dann wurde der Taschenkamm entfernt und die einzelnen Taschen mit einer Hamilton Pipette mit Puffer gespült. Die Proben sowie der Marker wurden in die Geltaschen eingefüllt und die Elektroden mit dem Netzgerät verbunden. Die Elektrophorese wurde in der Regel mit 35 mA je angeschlossenem Gel bei maximaler Spannung für 1,5 h durchgeführt.

Proteinbanden in einem Polyacrylamidgel können unter Verwendung des Triphenylmethanfarbstoffes Brilliant Blau R 250 angefärbt werden.<sup>150</sup> Zum Entwickeln der Proteinbanden wurde das Polyacrylamidgel in einer Schale mit einer 1:1 Mischung aus Coomassie-Färbelösung und 20% Essigsäure für 10 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel mit Wasser überdeckt und 6 min in der Mikrowelle aufgekocht.

### **3.2.7 Blue native- Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)**

Mit Hilfe der BN-PAGE ist es möglich nicht kovalente Proteinkomplexe und Aggregate mittels Elektrophorese der Größe nach aufzutrennen.<sup>151</sup> Hierzu wird bei dieser Methode anstatt dem Detergenz SDS der ebenfalls negativ geladene Farbstoff Coomassie Brilliant G-250 im Laufpuffer verwendet. Die negativ geladenen Farbstoff-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld ungeachtet ihres pI in Richtung der Anode. Des Weiteren wird im Auftragspuffer auf denaturierende Agenzien wie Harnstoff und DDT verzichtet, siehe Abschnitt 2.8. Die Zusammensetzung der verwendeten BN-Gele ist in Tabelle 8 in aufgeführt. Je nach Anwendung wurden die BN-Gele mit einem konstanten bzw. ansteigenden Vernetzungsgrad im Trenngel hergestellt.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der verwendeten BN-PAGE, die angegebenen Volumina sind ausreichend für die Herstellung von 5 Gelen.

Lösung	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	14 mL	0,7 mL
H <sub>2</sub> O monodest.	0,2 mL	1,6 mL
1 M Aminocaprinsäure, pH 7	16 mL	2,5 mL
1 M Bis-Tris, pH7	1,6 mL	0,25 mL
APS-Stammlösung (10%)	200 µL	40 µL
TEMED	20 µL	10 µL

Die Gele wurden mit derselben Apparatur wie bereits in Abschnitt 3.2.6 beschrieben angefertigt. Im Falle von Gradientengelen wurde zur Herstellung ein Gradientenmischer verwendet. Ein Gel wurde mit einer Spannung von 100 V bei maximaler Stromstärke gestartet. Nachdem der blaue Kathodenpuffer mit den Proben in das Trenngel eingetreten war, wurde die Elektrophorese mit 15 mA bei 100 V weitergeführt. Es dauerte zwischen 2 und 4 Stunden bis der blaue Kathodenpuffer an der Unterkante des Gels in den Anodenpuffer sickert und die Elektrophorese beendet war.

### 3.2.8 Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern (*Western Blot*)

Proteine können auch in geringen Mengen durch die Methode des *Western Blots* spezifisch nachgewiesen werden. Hierbei werden die aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamidgel per Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem geeigneten Antikörpern detektiert, z.B. durch die Kopplung von AP an den sekundären AK.<sup>152; 153</sup>

Für einen *Western Blot* wurden immer zwei identische Polyacrylamidgele verwendet (Charge, Anzahl der Taschen, Vernetzungsgrad, etc.). Mit einem Gel wurde der *Western Blot* angefertigt, das andere diente als Kontrolle und wurde mit Coomassie gefärbt. In der Auswertung konnten somit die spezifisch mit AK bzw. Coomassie angefärbten Proteinbanden zueinander in Relation gesetzt werden.

Für den *Blot* wurden 10 Filterpapiere und eine *Whatman®* Nitrocellulosemembran in der Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten und einige Minuten in Western Blot- Transferpuffer eingeweicht. Zunächst wurden fünf der Filterpapiere auf die Graphitanode der NOVOBLOT®-Apparatur gelegt. Es folgten die Nitrocellulosemembran, das Gel und die restlichen fünf Filterpapiere. Abschließend wurde die Anordnung glatt gestrichen, die Apparatur verschlossen

und mit dem Netzteil verbunden. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V, Dauer ca. 1 h.

Um unspezifische Signale zu verhindern wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit 3%igem Milchpulver in PBS blockiert, hierzu wurde die Membran für mind. 1 h bzw. ü.N. bei 4 °C stehend inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal für 5 min mit ca. 30 mL PBS 0,5% TWEEN® 20 gewaschen und 30 mL der Antikörperlösung I (AKI 10 µL, 1,5% Milchpulver in PBS) zugegeben und für mind. 1 h bei RT inkubiert. Es erfolgten erneut drei Waschschrte mit PBS TWEEN® 20. Dann wurden 30 mL Antikörperlösung II zugegeben (5 µL Anti-Maus-alkalische Phosphatase-Antikörper, 1,5% Milchpulver in 30 mL PBS) und für mind. 1 h inkubiert. Abschließend wurde dreimal mit 30 mL PBS TWEEN® 20 und einmal mit 30 mL Wasser gewaschen.

Für die Entwicklung des *Western Blot* wurde die Membran in eine gereinigte Plastikschaale überführt und mit 30 mL alkalische Phosphatase-Puffer überschichtet. Im Anschluss wurde von den Substraten NBT 12,5 µL und BCIP 70 µL zugegeben und die Nitrozellulosemembran ca. 1 h, schüttelnd bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Puffer verworfen und die Membran mehrmals mit Wasser abgespült.

### 3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration einer Lösung kann durch Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm nach dem Gesetz von Lambert-Beer bestimmt werden:

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

Hierbei ist  $\varepsilon$  der molare Extinktionskoeffizient,  $d$  repräsentiert die Schichtdicke der Küvette und  $c$  steht für die Konzentration der Proteinlösung. Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren die aromatischen Reste der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin und die von Cysteinresten gebildeten Disulfidbrücken. Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  eines beliebigen Proteins kann anhand von dessen Aminosäuresequenz nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$\varepsilon = (280)(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (\#\text{Trp})(5,500) + (\#\text{Tyr})(1,490) + (\#\text{Cystine})(125)$$

In dieser Gleichung symbolisiert # die Anzahl der angeführten Aminosäuren bzw. der im untersuchten Protein realisierten Disulfidbrücken.<sup>154</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten sowie der molaren Massen mit dem Programm *PROTEIN CALCULATOR v3.3* durchgeführt.<sup>155</sup> Mit den erhaltenen Werten und den  $A_{280}$  Messungen (Nanodrop bzw. Spektralphotometer) wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt.



### 3.2.10 Dialyse

Der Pufferaustausch von gelösten Proteinen wurde standardmäßig mittels Dialyse durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch entsprechender Länge und Porengröße gefüllt, gut verschlossen und mind. 2 h gegen ein großes Volumen des gewünschten Puffers dialysiert. Je nach MW des Zielproteins wurden Dialyseschläuche mit unterschiedlichem MWCO verwendet. Dieser Wert gibt das relative Molekulargewicht der Teilchen an, die zu mindestens 90% von der Membran zurückgehalten werden, kleinere Moleküle wie Pufferbestandteile und Salze können die Membran ungehindert passieren.

Eine Dialyse erfolgte, wenn nicht anders beschrieben ü.N. bei 4 °C gegen 5 Liter des gewünschten Puffers, am Folgetag wurde die Dialyseflüssigkeit ggf. erneuert. Es wurden Dialyseschläuche der Firma Roth bzw. Visking mit den Ausschlussgrößen von 3,5 kDa bzw. 12-14 kDa verwendet.

### 3.2.11 Konzentration von Proteinen durch Ultrafiltration

Zur Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen wurden je nach MW des Zielproteins verschiedene Ultrafiltrationseinheiten verwendet: Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, MWCO: 3 kDa), Vivaspin 15 (Sartorius, MWCO: 10 kDa). Neben der Konzentration von Proteinlösungen konnte mit dieser Methode ebenfalls ein Pufferaustausch durchgeführt werden. Der Gebrauch der Ultrafiltrationseinheiten erfolgte nach den Anweisungen der Hersteller.

### 3.2.12 TEV-Protease-Spaltung

Bei der TEV-Protease aus dem Tabakmosaikvirus (*Tobacco Etch Virus*) handelt es sich um eine ca. 27 kDa große Cysteinprotease die sehr selektiv innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz spaltet.<sup>156</sup> Die optimale Erkennungssequenz lautet: ENLYFQ-(G/S), die proteolytische Spaltung erfolgt zwischen Glutamin und den relativ kleinen Aminosäuren Glycin bzw. Serin.<sup>157; 158</sup> Allerdings toleriert das Enzym Modifikationen der Erkennungssequenz, beispielsweise sind in der P1' Position von Prolin abgesehen alle natürlich vorkommenden Aminosäuren denkbar.<sup>159</sup> Die Spaltung mittels TEV-Protease erfolgte mind. für 2 h oder ü.N. bei RT oder 37 °C. Die verwendete TEV-Protease wurde nach SOP der Arbeitsgruppe selber rekombinant produziert.

### 3.2.13 Chemische Kopplung von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid

Nach Spaltung eines rekombinanten Fusionsproteins mittels TEV-Protease in der Erkennungssequenz ENLYFQ-S verbleibt ein N-terminales Serin am Protein. Dieses N-terminale

---

Serin kann chemisch mit einem Fluorophor modifiziert werden.<sup>140; 160</sup> Hier wurde mit dieser Methode die Machbarkeit einer chemischen Kopplung nachgewiesen.

In einem 15 mL Reaktionsgefäß wurde gereinigtes Protein mit dem 10fachen molaren Überschuss an Natriumperiodat versetzt und 20 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das N-terminale Serin vom Natriumperiodat durch Abspaltung von Formaldehyd zu einem Serin-Aldehyd oxidiert. Im Anschluss wurde das 20fache Äquivalent an Fluorescein-5-Thiosemicarbazid hinzugegeben und der Ansatz für weitere 16 h bei RT inkubiert.

Zum Nachweis des gekoppelten Fluoreszenzmarkers wurden modifizierte und unbehandelte Proben mittels SDS-PAGE untersucht. Die im Gel aufgetrennten Proben wurden auf dem UV-Tisch mit 312 nm angeregt. Bei erfolgreicher Kopplung war eine diskrete Fluoreszenz in entsprechender Relation zum Marker zu erkennen.

### 3.2.14 Gefriertrocknung

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen oder zur Bestimmung der Ausbeute wurden Proteine gefriergetrocknet. Zunächst wurde die Proteinlösung in einen Rundkolben überführt und ihre Oberfläche durch Schwenken vergrößert, gleichzeitig wurde die Proteinlösung langsam mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem vollständigen Erstarren der Lösung wurde der Kolben ü.N. an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen. Hier sublimierten Wasser und andere Lösungsmittel und wurden von einer Pumpe abgezogen.

Übrig bleiben das trockene Protein und eventuell noch in der Lösung vorhandene Salze. Das fertige Lyophilisat wurde aus dem Rundkolben entnommen und bei RT gelagert.

### 3.2.15 Circular dichroismus Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung von optisch aktiven Molekülen und Polymeren. In Bezug auf Proteine macht sich diese Technik den unterschiedlichen Dichroismus von Sekundärstrukturelementen zu Nutze. Im UV-Bereich von 190 nm bis 250 nm erhält man je nach Komposition eines Proteins eine charakteristische Kurve mit diskreten Maxima und Minima. Die aufgenommene Kurve ist hierbei die Summe von definierten Kurven für  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, *random coil* Bereiche und zu einem geringen Anteil der Disulfidbrücken zu verstehen. Hieraus lassen sich zum einen Informationen für eine Strukturvorhersage beziehen, zum anderen kann der erhaltene „Fingerabdruck“ eines Proteins auch als Bezugspunkt für Denaturierungsexperimente oder Schmelzpunktbestimmungen dienen, da sich eine durch thermische oder denaturierende Agenzien verursachte Veränderung in einer Deformation der Bezugskurve niederschlägt.<sup>161</sup> In dieser Arbeit wurde ein Jasco J-810

---

Spectropolarimeter (Arbeitsgruppe Reggelin, Technische Universität Darmstadt) mit einer Quarzküvette (Schichtdicke 1,0 mm) verwendet.

### 3.2.16 Thermofluormessung

Bei zunehmender Entfaltung durch Temperaturerhöhung oder denaturierende Agentien wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid werden hydrophobe Bereiche eines Proteins, die bei korrekter Faltung im Protein größtenteils verborgen vorliegen, dem Lösungsmittel zugänglich. In wässriger Lösung wird die Fluoreszenz des verwendeten Fluorophors SYPRO Orange (Sigma-Aldrich, x5000) von den umgebenden Wassermolekülen gequencht. Kommt es in Folge zunehmender Entfaltung zu ionischen oder hydrophoben Wechselwirkungen, kann eine Fluoreszenz angeregt werden. Hierdurch können Proteineigenschaften wie Stabilität oder Schmelzpunkt bestimmt werden. Die Veränderungen in der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Temperatur wurde mit einem Thermocycler (BioRad 96CFX RT-PCR), 0,5 °C/10 sec verfolgt. Die Experimente wurden (wenn nicht anders beschrieben) in 50 mM Tris/HCl pH 7,8 mit einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/mL durchgeführt. Zur Destabilisierung der untersuchten Proteine wurden bis zu 50 mM DDT und 3,9 M NaCl zugegeben. Als denaturierende Agenzien wurde bis zu 4 M Guanidiniumhydrochlorid bzw. Urea in Kombination mit 10 mM DTT und 2 M NaCl eingesetzt. Den gezeigten Messpunkten liegt jeweils eine Doppelt- bzw. Dreifachbestimmung zugrunde. Die  $T_m$ -Werte wurden mit der Gerätesoftware aus den Schmelzkurven berechnet.

### 3.2.17 *Dynamic light scattering*

Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine etablierte Standardmethode um den hydrodynamischen Radius von gelösten Molekülen zu bestimmen oder um Aggregationszustände zu charakterisieren. Laserlicht wird an den Molekülen einer Lösung gestreut und über die hierbei aufgezeichnete zeitliche Änderung der Streulichtintensität kann der Diffusionskoeffizient gefittet werden. Dieser wiederum dient als Grundlage zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius. Die DLS Technik hat sich vor allem in der Proteinkristallographie etabliert um die Kristallisierbarkeit von Proteinproben im Hinblick auf das Vorhandensein von Proteinaggregaten zu bestimmen, da sich inhomogene oder in diesem Fall besser als Polydispers bezeichnete Proteine störend auf den Kristallisationsprozess auswirken können. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 1 mg/mL.

### 3.2.18 Lipase-Aktivitätstest in Mikrotiterplatten

Die hydrolytische Aktivität der Lipase Lip2p wurde durch Spaltung des chromogenen Substrates *p*-Nitrophenylpalmitat untersucht. Die Akkumulation des Spaltproduktes *p*-Nitrophenol wurde

über einen Zeitraum von 30 min bei 410 nm im ELISA-reader (TECAN GENios) verfolgt. Die Zusammensetzung der verwendeten Substratlösungen ist in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung der im Lipase-Aktivitätstest verwendeten Substratlösung:

Lösung	Konzentration
<i>p</i> -NPP in Isopropanol	8 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
Natriumdesoxycholat	10,7 mM
Gummi arabicum	0,11% (w/v)

Vor einer Messung wurden 240  $\mu$ L Substratlösung für 5 min bei 50 °C inkubiert und im Anschluss mit 10  $\mu$ L Enzymlösung in die Kavität deiner Mikrotiterplatte gegeben. Die Enzymaktivität *unit* wurde definiert als die Menge an Enzym die benötigt wird um 1  $\mu$ mol *p*-Nitrophenol pro Minute freizusetzen. Um Schwankungen und Messungenauigkeiten auszugleichen wurden alle Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 3.2.19 Protease-Inhibitionstest

Der Protease-Inhibitionstest wurde durchgeführt wie bereits in Avrutina 2005 und Glotzbach 2013 beschrieben.<sup>162; 163</sup> Nach Bestimmung der Konzentration an aktiver Protease (Trypsin bzw. Matriptase) wurde die Aktivität des Inhibitors in Doppelbestimmungen getestet. Hierbei wurde eine 1:1 Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym angenommen. Die apparente Inhibitionskonstante ( $K_i^{app}$ ) wurde mittels Morrison Gleichung aus den experimentell gewonnenen konzentrationsabhängigen relativen Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt.<sup>164</sup> Diese Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Basierend auf der  $K_i^{app}$  wurde die substratabhängige Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) berechnet.

### 3.2.20 ABTS-Test

Die enzymatische Aktivität des Enzyms Goase M1 wurde in einem Goase-HRP gekoppelten Assay untersucht.<sup>165</sup> Das bei der Oxidation von Galaktose entstandene  $H_2O_2$  wird von dem Koenzym des Aktivitätstests HRP zu  $H_2O$  reduziert, wobei das grün gefärbte Radikalkation ABTS gebildet wird. ABTS fungiert hierbei als Elektronenakzeptor und nimmt die von der HRP generierten Elektronen auf. Das verwendete Protokoll ist in Tabelle 10 aufgeschlüsselt.

**Tabelle 10:** Die folgenden Volumina wurden in der Reihenfolge von oben nach unten für den ABTS Test in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben.

Probe	200 µL
CuSO <sub>4</sub> (5 mM)	10 µL
ABTS-Lösung (0,5 mM)	10 µL
HRP (50µg/mL) in PBS, pH 7,4	1 µL
D-Galaktose (50 mM)	10 µL

Die Proben wurden vor dem Assay gegen PBS pH 7,4 dialysiert, der Reaktionsverlauf wurde über einen Zeitraum von 20 min im ELISA-reader (TECAN GENios) bei 405 nm verfolgt. Die Experimente wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

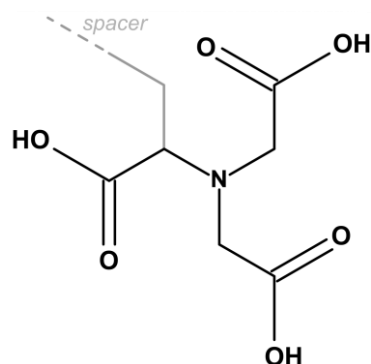
### 3.3 Säulenchromatographische Methoden

#### 3.3.1 *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)

Für die FPLC-Reinigung von Proteinen wurden zwei sehr ähnliche ÄKTA *purifier* Modelle der Firma Amersham Pharmacia Biotech (GE Healthcare) verwendet. Das ältere System 1 bestand aus den folgenden Komponenten: Frac-900, UV-900, P-900, IV-908, PV-908, M-925 und INV-907. System 2 setzte sich aus den Komponenten Box-900, UPC-900 (Hg-Lampe für 254 nm oder 280 nm bzw. Zn-Lampe für 214 nm), P-900, INV-907, M-925 und Frac-920 zusammen.

#### 3.3.2 Immobilisierte Metall Ionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Die hier verwendete Säulenmatrix Chelating Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare) präsentiert an der Matrixoberfläche Nitrilotriessigsäuremoleküle (NTA), siehe Abb. 9. In dieser Arbeit wurden vorgepackte 1 mL Säulen einzeln oder Reihe mit der ÄKTA verbunden bzw. Gravitationssäulen mit 1-5 mL Säulenvolumen verwendet.



**Abb. 9:** Der an der Säulenmatrix immobilisierte Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) ist in der Lage über seine drei Carboxylgruppen ein  $\text{Ni}^{2+}$  Atom zu komplexieren. Die Immobilisierung an der Matrix erfolgt über *spacer*, in grau angedeutet. Natürlich vorkommende wie auch rekombinant hergestellte Proteine mit mehreren Histidinresten in relativer räumlicher Nähe können reversibel gebunden werden.<sup>166, 167</sup>

Wenn nicht anders aufgeführt wurden Kalibrierung, Betrieb, Reinigung und Lagerung nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.3.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Die Gelfiltrationschromatographie wird auch Größenausschlusschromatographie genannt, da die Auftrennung bei dieser Methode lediglich aus dem hydrodynamischen Volumen der Analyten resultiert. Das heterogene Probengemisch wird mit einer mobilen flüssigen Phase über eine poröse stationäre Phase (Superdex 75 pg 16/60, Superdex 200 pg 16/60 bzw. 60/600 von GE Healthcare) aufgetrennt. Abhängig von ihrer Größe legen Moleküle im Verlauf ihrer Säulenpassage unterschiedlich lange Wegstrecken zurück. Je kleiner ein Molekül desto größer ist der ihm zur Verfügung stehende Diffusionsraum. Auf diese Weise eluieren die Bestandteile einer heterogenen Probe absteigend ihrer Größe. Als mobile Phase wurden steril filtrierte und entgaste Puffer verwendet. Für eine erhöhte Auflösung sowie Ausbeute betrug das Probenvolumen üblicherweise 50% der Probenschleife und 1% des Säulenvolumens, in Einzelfällen erfolgte der Probenauftrag mittels Superloop (GE Healthcare).

### 3.3.4 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Bei der IEX wird prinzipiell zwischen Kationen- und Anionenaustauschern unterschieden. Je nach Pufferbedingungen, isoelektrischem Punkt und der daraus resultierenden Nettoladung des Proteins welches gereinigt werden soll, wird eine Säulenmatrix entgegengesetzter Ladung gewählt. Hierbei kommen je nach Stufe der Reinigung verschiedene Säulenmaterialien in Frage, die sich nach Eigenschaften wie Kapazität und Ladungsdichte unterscheiden. Eine Elution der gebundenen Proteine kann durch eine Änderung des pH-Wertes oder einer Erhöhung der Ionenkonzentration der mobilen Phase eingeleitet werden. Neben der Abtrennung von

Kontaminationen mit sich hinreichend unterscheidenden Ladungen kann mit dieser Reinigungsmethode auch eine Erhöhung der Konzentration des Zielproteins im Elutionspeak erreicht werden.

### **3.4 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde mit *PureYield™ Plasmid Miniprep System Kit* (Promega) bzw. *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (ZYMO RESEARCH) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.2 Fällung von DNA mit Ammoniumacetat und Ethanol**

Die Ethanol/ Ammoniumacetatfällung wird zur Konzentration bzw. Reinigung von DNA verwendet. Mit ihr werden aus Restriktions- bzw. Ligationsansätzen unerwünschte Puffersubstanzen, Proteine und Restriktionsenzyme entfernt. Bei dieser Methode wird die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, dies führt zu einer Erhöhung der Dielektrizitätskonstante und verringert somit die Abstoßung der negativ geladenen Phosphodiestergruppen der DNA. Hierdurch wird bei Lösungsmittelentzug durch Zugabe von Ethanol die DNA gefällt.

Die DNA-Lösung wurde mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O auf 200 µL aufgefüllt und mit 20 µL 7 M Ammoniumacetat-Lösung sowie 660 µL 99,8%igem Ethanol versetzt. Nach mindestens 1 h Inkubation bei -20 °C wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C und 13 k rpm (Eppendorf-Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die pelletierte DNA bei 37-65 °C im Heizblock getrocknet. Sobald jegliches Ethanol aus der Probe verflüchtigt war, wurde das Pellet in dem gewünschten Volumen monodest. H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **3.4.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme die eine mehr oder weniger spezifische Sequenz auf einem DNA-Molekül erkennen und den Strang durch Hydrolyse spalten. In der Molekularbiologie werden am häufigsten ATP-unabhängige Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Diese Enzyme spalten die DNA innerhalb einer meist 6-8 bp langen palindromischen Erkennungssequenz. Die Affinität dieser Enzyme für palindromische Erkennungssequenzen beruht in ihrem weitverbreiteten Aufbau als Homodimer. Je nach Enzym werden verschiedenartige DNA-Enden generiert.

---

Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller des Enzyms (MBI Fermentas GmbH, NEB, Boehringer Mannheim GmbH) empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Die DNA wurde in der Regel in einer Endkonzentration des Spaltungsansatzes von 100 ng/ $\mu$ L mit 1-2 Einheiten Enzym pro Mikrogramm DNA inkubiert. Die Inkubationsdauer der Spaltung wurde je nach Spaltansatz variiert und betrug mindestens 45 min bei 37 °C im Fall einer Testspaltung. Bei einer präparativen Spaltung erfolgte üblicherweise eine Inkubation des Spaltansatzes für einige Stunden bzw. über Nacht.

#### 3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse oder Reinigung von DNA-Proben wurde, abhängig von der Größe des gewünschten Fragmentes, 1% bzw. 2% Agarose (w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Nachdem das Gel auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden 20 mL der flüssigen Agarose mit Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/mL) versetzt, in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm für die entsprechenden Probenaschen eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde mit TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit einem Sechstel Volumen Sucrosefarbmarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Bei jedem Lauf wurde ebenfalls eine Geltasche mit dem entsprechenden Längenstandard beladen (2.4). Die Elektrophorese erfolgte für ca. 20-45 min bei einer Spannung von ca. 100 V. Die Auswertung erfolgte durch Anregung des mit den Proben interkalierten EtBr mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm. Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen den Basen der DNA bzw. RNA. Dieses Phänomen wird hauptsächlich durch das  $\pi$  -  $\pi$  *stacking* der EtBr-Moleküle mit der DNA hervorgerufen.<sup>168</sup>

#### 3.4.5 Extraktion von DNA aus einem Agarosegelen

Zur Isolierung diskreter DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden verschiedene kommerziell erhältliche Kits verwendet, siehe Abschnitt 2.7. Bei der Extraktion wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die präparierte DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym verknüpft DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden über ihr Phosphorsäure-Desoxyribose-Rückgrat zu einem Ligationsprodukt. Im Fall von Vektormodifikationen wurde ein drei- bis fünffach molarer Überschuss an Insert-DNA gegenüber der Plasmid-DNA eingesetzt und die Reaktion unter Zugabe von 2  $\mu$ L 10fach T4-DNA-Ligase-Puffer und ca. 2 Einheiten T4-DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20  $\mu$ L durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 2 h bis 60 h



bei einer Temperatur von ca. 15 °C – 37 °C. Im Anschluss erfolgte die Reinigung des Ansatzes (2.7) oder die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen (3.1.5 bzw. 3.1.7).

### 3.4.7 PCR (*Polymerase chain reaction*)

Die 1987 von Karry B. Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion, ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente.<sup>169</sup> Mit Hilfe der entsprechenden Oligonukleotide (*Primer*) ist es möglich aus einem komplexen DNA Gemisch selektiv ein DNA-Fragment zu amplifizieren. Für eine PCR-Reaktion werden up- und lo-*Primer*, eine Matrize, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; kurz dNTPs), eine hitzestabile Polymerase sowie der entsprechende Puffer benötigt.<sup>170</sup>

Eine PCR-Reaktion besteht üblicherweise aus ca. 30 identischen Temperaturzyklen, die wiederum in drei Phasen untergliedert sind: Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation. Zu Beginn wird die DNA-Matrize (dsDNA) durch Erhitzen (ca. 96 °C) in ihre Einzelstränge (ssDNA) aufgeschmolzen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch bis zu einer definierten Temperatur abgekühlt (ca. 54 °C), hier hybridisieren die Oligonukleotid-Primer an die Matrizen-DNA (*annealing*). Über die freie 3'-Hydroxylgruppe der *Primer*, kann im letzten Schritt bei ca. 72 °C die Kettenverlängerung durch eine thermostabile DNA-Polymerase durchgeführt werden.

PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µL durchgeführt. Die verwendeten Puffer sowie die thermostabile *Taq*-Polymerase wurden von diversen Herstellern bezogen bzw. selbst hergestellt, siehe Abschnitt 2.6. Die Zusammensetzung einer Standard-PCR ist in der folgenden Tabelle aufgelistet:

**Tabelle 11:** Zusammensetzung einer Standard-PCR mit einem Endvolumen von 50 µL.

Lösungen	Volumina
Matrizen-DNA	1 µL
Primer up	1 µL
Primer lo	1 µL
dNTPs	1 µL
H <sub>2</sub> O monodest	40 µL
10xPuffer	5 µL
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µL

Um einer Verdunstung während der PCR Reaktion entgegenzuwirken wurde jedes Reaktionsgefäß mit 1-2 Tropfen Paraffinöl überschichtet. Zum Ausgleich von

Pipettierungenauigkeiten wurden bei n PCR-Reaktionen die in Tabelle 11 aufgeführten Volumina mit n+1 multipliziert, durchmischt und auf n Reagiergefäße aufgeteilt.

Zeitspanne und Temperatur ergaben sich aus der Länge des zu amplifizierenden DNA Abschnitts, der Länge der Primer und dem G/C Gehalt der Matrizen-DNA. Die Schmelztemperatur  $T_M$  der verwendeten Oligonukleotid wurde vom Hersteller angegeben (Sigma Aldrich). Sie können allerdings auch nach folgender empirischer Formel berechnet werden, welche sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt:

$$T_M = 64,3 + 0,41 \cdot \left( \% \frac{G}{C} \right) - \frac{650}{n}$$

Die optimale *annealing*-Temperatur  $T_A$  einer PCR-Reaktion konnte anhand der folgenden Formel berechnet werden:

$$T_A = \left( \frac{T_{M_1} + T_{M_2}}{2} \right) - 3^\circ C$$

$T_{M_1}$  und  $T_{M_2}$  stehen dabei für die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten *Primer*. In Tabelle 12 ist das Temperaturprofil einer Standard-PCR zusammengefasst. Das initiale Aufschmelzen der DNA Moleküle sowie der finale Elongationsschritt haben sich als zielführend erwiesen und wurden stets in den verwendeten Programmen berücksichtigt.

**Tabelle 12:** Standard-PCR Programm zur Amplifikation eines 1 kbp Fragmentes.

Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Zeit in sec	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1x
Denaturierung	98	30	30x
Hybridisierung	52	5	
Elongation	72	45	
Finale Elongation	72	300	1x
Wartestellung	RT	∞	1x

Die PCR-Ansätze wurden direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

### 3.4.8 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine PCR-Variante zur schnellen Durchmusterung beliebig vieler Einzelklone, beispielsweise zur Identifikation positiver Transformanten nach einer Ligation. Hierzu werden die Bakterienzellen in den fertigen PCR-Ansatz gegeben und durch die hohen Temperaturen während der PCR-Reaktion zum Platzen gebracht, siehe Tabelle 13. Dadurch wird die bakterielle DNA für die Oligonukleotide und die Polymerase zugänglich. Falls der entsprechende Einzelklon eine korrespondierende DNA-Matrize enthält kann ein PCR-Produkt gebildet werden.

**Tabelle 13:** Kolonie-PCR Programm zur Durchmusterung von *E. coli* Einzelklonen.

Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Zeit in sec	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	300	1x
Denaturierung	96	30	30 x
Hybridisierung	52	30	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	300	1x
Wartestellung	RT	∞	1x

Im Anschluss wurden die Suspensionen der einzelnen Reagiergefäße der Kolonie-PCR mittels Agarosegelelektrophorese ausgewertet (3.4.4). Nur positive Klone sollten in der Lage sein zusammen mit den spezifischen Oligonukleotiden ein Amplifikat entsprechender Größe zu liefern. Um die Aussagekraft dieser Methode zu verstärken wurden bei jeder Kolonie-PCR neben den Einzelklonen ebenfalls Kontrollen (positiv und/ oder negativ) wie beispielsweise ein unveränderter Ausgangsvektor mitgetestet.

### 3.4.9 Modifikation von Plasmid-DNA mittels PCR

Die verwendete Methode von Liu und Naismith<sup>171</sup> orientiert sich an dem Quickchange Kit (Stratagene) zeichnet sich aber aufgrund eines verbesserten Primerdesign durch eine erhöhte Anzahl positiver Transformanten aus. Mit dieser Methode können ortsgerichtet einzelne Nukleotide oder Nukleotidsequenzen auf Plasmid-DNA deletiert bzw. eingefügt werden. Das verwendete PCR Programm ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

**Tabelle 14:** PCR-Programm für die ortsspezifische Mutation und Amplifikation von Plasmid-DNA.

Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Zeit in sec	Zyklen
1	95	300	1x
2	95	60	11x
	58	60	
	72	960	
3	95	60	2x
	50	60	
	72	960	
4	72	420	1x
	4	∞	

Um selektiv die methylierte Matrizen-DNA zu verdauen, wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *DpnI* versetzt und mind. 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Restriktionsspaltung direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen verwendet (3.1.5 oder 3.1.7) bzw. mittels Ammoniumacetatfällung gereinigt (3.4.2). Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR auf die Präsenz des gewünschten Plasmides überprüft (3.4.8). Die abschließende Verifizierung positiver Einzelklone erfolgte mittels Sequenzierung.

---

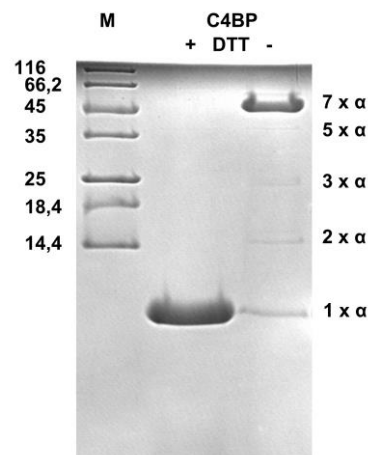
## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Reihe unterschiedlicher Varianten der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP kloniert und produziert. Das übergeordnete Ziel lag hierbei primär in der Generierung einer geeigneten Variante zur Strukturaufklärung der  $7\alpha$ -Oligomerisierungsdomäne (4.1). Die Informationen der gelösten dreidimensionalen Struktur der  $7\alpha$ -Oligomerisierungsdomäne dienten als Ausgangspunkt zur *in silico* Modellierung der drei übrigen *in vivo* beschriebenen Isoformen. Des Weiteren wurden anhand der Strukturinformationen definierte Mutanten erzeugt. Einige dienten zur Identifikation der für die Oligomerisierung essentiellen Bereiche, andere dazu den Beitrag bestimmter Aminosäuren oder Proteinabschnitte zu der Gesamtstabilität zu erforschen (4.2). In der Literatur und in zwei vorangegangenen Diplomarbeiten wurden bereits Grenzen bei der rekombinanten Produktion von C4BP-Fusionsproteinen aufgezeigt.<sup>69; 172; 173</sup> Daher wurde in dieser Arbeit die Methode des Proteinspleißens als posttranslationale Methode zur *in vitro* Funktionalisierung untersucht. Eine effektive chemische bzw. enzymatische *in vitro* Funktionalisierung würde neue Möglichkeiten der Modifikation der C4BP Oligomerisierungsdomäne eröffnen. Das *scaffold* kann mittels der etablierten Produktionsmethode aus *E. coli* bereitgestellt werden. Die Peptide und Proteine zur Funktionalisierung können synthetisch mittels SPPS oder rekombinant in einem anderen Expressionssystem generiert werden. Daher wird abschließend ein Expressionssystem in der nicht-konventionellen Hefe *Y. lipolytica* als mögliche Quelle dieser Peptide und Proteine vorgestellt und evaluiert (4.3).

### 4.1 Strukturanalyse der C4BP Oligomerisierungsdomäne

Die ersten Versuche die Struktur der  $7\alpha$ -Isoform des hC4BP mittels Röntgenstrukturanalyse zu lösen wurden bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Joop van den Heuvel (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig) unternommen. Diese initialen Kristallisationsversuchen wurden mit dem gereinigten Wildtypprotein durchgeführt (Abb. 10).



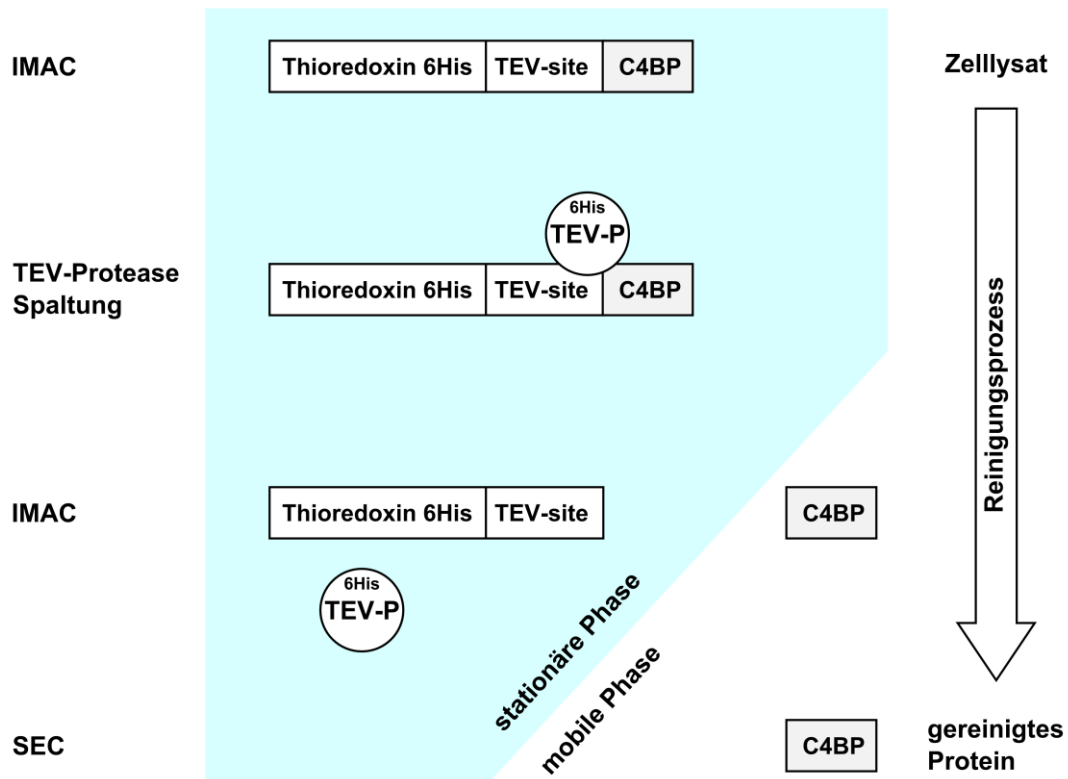
**Abb. 10:** SDS-PAGE Analyse der gereinigten hC4BP Wildtyp Oligomerisierungsdomäne. Mit dieser Charge wurden die initialen Kristallisationsversuche durchgeführt. Das Protein wurde in der mittleren Spur mit (+) und in der Spur rechts am Rand ohne DTT (-) aufgetragen. MW Monomer: 7,5 kDa, MW Heptamer: 52,5 kDa. In der Spur ohne DTT sind neben der Bande des Heptamers weitere Banden zu erkennen. Die Größen dieser diskreten Banden entsprechen vollständig bzw. teilweise denaturiertem Oligomer: Mono-, Di-, Tri- bzw. Pentamer. (Modifiziert nach Hofmeyer Diplomarbeit<sup>173</sup>)

Für die Aufklärung der 3D-Struktur eines Proteins mittels Röntgenstrukturanalyse muss zunächst das zu untersuchende Protein möglichst sauber und in gewissen Mengen (>10 mg) vorliegen. Die Produktion und Reinigung der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne wird im folgenden Abschnitt erläutert (4.1.1). Das gereinigte Protein wird eingesetzt, um Pufferbedingungen zu identifizieren in denen Kristallwachstum stattfinden kann. Einige Proteine kristallisieren in wenigen Tagen oder Wochen andere hingegen nie. Die gefundenen Bedingungen werden daraufhin verfeinert, um das Wachstum möglichst geordneter und großer Kristalle zu forcieren. Die Qualität der Proteinkristalle ist entscheidend für die Qualität der Daten aus der Röntgenstrukturanalyse. Produktion, Reinigung und Kristallwachstum waren beim hC4BP unproblematisch. Die Kristalle des Wildtypproteins lieferten jedoch lediglich Auflösungen von bestenfalls 3 Å bis 4 Å was für eine *de novo* Strukturaufklärung zu gering war. Aus diesem Grund wurden verschiedene andere Methoden für die Aufklärung der Kristallstruktur eingesetzt (4.1.3). Im Folgenden wird zunächst die Produktion und Reinigung der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne vorgestellt.

#### 4.1.1 Produktion und Reinigung von C4BP

Die Produktion von hC4BP wurde im *E. coli* Stamm Origami (DE3) durchgeführt. Die elektrokompenten Bakterien wurden mit dem Plasmid pET32a C4BP wt transformiert (3.1.5) und über Nacht auf Selektivplatten bei 37 °C inkubiert. Das Expressionsplasmid wurde in Einzelklonen mittels Kolonie-PCR nachgewiesen (3.4.8) und die Proteinproduktion positiver Einzelklone in einem Expressionstest verglichen (3.2.2). Die präparative Produktion erfolgte

zunächst im Schüttelkolben, später im Fermenter (3.2.3 und 3.2.4). Die chromatographische Reinigung der C4BP-Varianten erfolgte nach dem in Abb. 11 abgebildeten Schema.

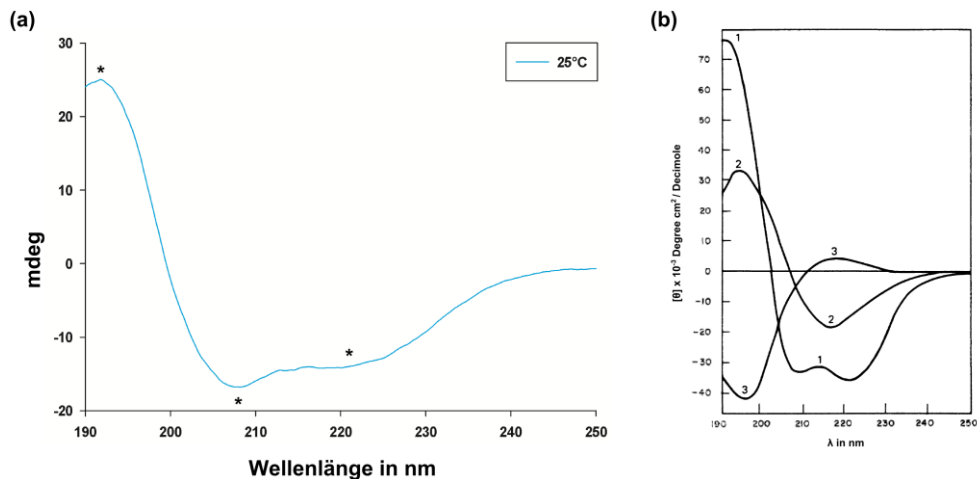


**Abb. 11:** Schema der angewendeten Reinigungsstrategie. Das Fusionsprotein wurde zunächst über das 6His-Epitop auf der IMAC-Säulenmatrix immobilisiert (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde lediglich ein Monomer und nicht das komplette Heptamer abgebildet). Im Anschluss wurde das Zielprotein durch die TEV-Protease (TEV-P) von Thioredoxin (Trx) abgespalten. In einer zweiten IMAC wurde die Oligomerisierungsdomäne von Trx und TEV-P abgetrennt. Die abschließende Reinigung erfolgte durch SEC. Die Trx-C4BP Fusionsproteine wurden während der Reinigung zunächst über das 6His-Epitop an der stationären Phase immobilisiert, nach der TEV-Protease-Spaltung befand sich das C4BP in der mobilen Phase.

Parallel zu den Versuchen die Struktur der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des hC4BP mittels Röntgenstrukturanalyse zu lösen, wurde das Wildtypprotein CD-spektroskopisch untersucht. Die aufgenommenen Daten lieferten erste experimentelle Hinweise auf die Sekundärstrukturkomposition der Oligomerisierungsdomäne.

#### 4.1.2 Sekundärstrukturanalyse

Die CD-Spektroskopie ist eine etablierte Methode zur Analyse der Sekundärstrukturkomposition von Proteinen. Für die Aufnahme des Spektrums in Abb. 12 wurde lyophilisiertes hC4BP in einer Konzentration von 0,1 mg/mL in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 eingesetzt. Es wurde ein Bereich von 190 nm bis 250 nm mit einer Geschwindigkeit von 60 nm/min gescannt. Um Messungenauigkeiten zu minimieren, wurde die in Abb. 12 abgebildete Kurve aus zehn Einzelmessungen berechnet.



**Abb. 12:** CD-spektroskopische Untersuchung der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP. **(a)** *In-house* Messung, durchgeführt bei Raumtemperatur (25 °C).  $\alpha$ -helikale Charakteristika sind mit Asterisken (\*) gekennzeichnet. **(b)** CD-Spektroskopische Vergleichskurven von poly-L-Lysin in 1:  $\alpha$ -helikaler, 2:  $\beta$ -Faltblatt bzw. 3: Random-Coil Konformation (Modifiziert nach Greenfield & Fasman 1969<sup>174</sup>).

Die CD-spektroskopische Untersuchung lieferte erste *in-house* generierte Informationen über die Komposition der Sekundärstruktur der Oligomerisierungsdomäne. Ein Vergleich mit Standardkurven aus der Literatur legte nahe, dass die Natur dieser Struktur größtenteils  $\alpha$ -helikalen Ursprungs ist und sich zu einem geringen Prozentsatz aus ungeordneten Bereichen zusammensetzt. Die Dominanz der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur zeigt sich in dem Maximum nahe 190 nm und den beiden Minima bei 208 nm und 222 nm im Kurvenverlauf (Abb. 12).

#### 4.1.3 SeMet Markierung

Die *ab initio* Aufklärung (direkte Methode) der Kristallstruktur eines unbekannten Proteins ist die Methode der Wahl, benötigt jedoch Auflösungen kleiner 1,2 Å und eignet sich eher für Moleküle, die aus weniger als 1000 Atomen bestehen.<sup>175</sup> Im Falle der C4BP-Oligomerisierungsdomäne wurden mit dem Wildtyp (1052 Atome je Monomer) bei den besten Versuchen nur ca. 3 Å erreicht, was für die Auflösung der Struktur nicht ausreichte. Der Knackpunkt bei der Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse ist die Lösung des Phasenproblems: Bei der Bestrahlung eines Proteinkristalls mit Röntgenstrahlen entsteht aufgrund ihrer Beugung an den Elektronenwolken eine Verschiebung der einzelnen Phasen. Auf ihrem Weg durch das Kristallgitter führt diese Beugung zu Interferenz die zur Verstärkung bzw. Auslöschung einzelner Wellen führt. Die Summe aller Interferenzereignisse wird am Ende als Diffraktionsmusters aufgezeichnet und enthält lediglich Informationen über die Amplitude (bzw. Intensität) der einzelnen Spots, die Phaseninformation geht verloren. Um eine Elektronendichteverteilung mittels Fourier-Transformation berechnen zu können, werden allerdings Amplitude und Phase benötigt. Neben dem *ab initio phasing* gibt es daher noch



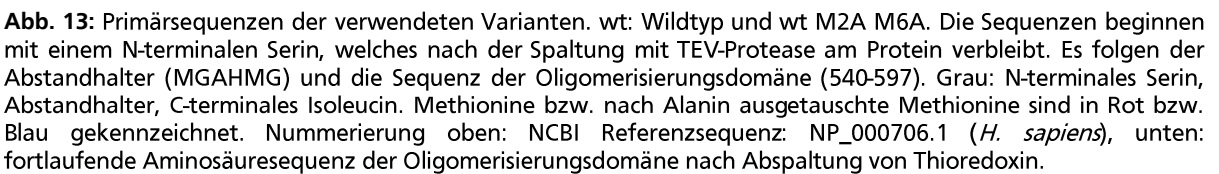
---

diverse andere Methoden die Phase experimentell zu bestimmen.<sup>176</sup> Für die Aufklärung der Struktur des hC4BP wurden drei dieser Methoden angewendet.

Erstens kann die Phase über molekularen Ersatz bestimmt werden. Hierzu benötigt man eine Struktur, die große Ähnlichkeit mit dem unbekannten Protein hat. Die Kristallisation von Proteinen zusammen mit Fusionspartnern bekannter Struktur wie bspw. Barnase, Maltose-Bindeprotein (MBP), Glutathion-S-Transferase (GST) oder Thioredoxin (Trx) hat sich in der Vergangenheit bei der Lösung unbekannter Strukturen als zielführend erwiesen.<sup>177; 178</sup> Aus diesem Grund wurde versucht, die Struktur der Oligomerisierungsdomäne über eine Kristallisation des Trx-C4BP Fusionsproteins zu lösen. Da die Struktur des verwendeten Thioredoxins bekannt ist, hätte dieses als Kristallisations-Anhängsel bei der Lösung des Phasenproblems verwendet werden können. Allerdings wurden keine Kristalle des Trx-C4BP Fusionsproteins erhalten. Wahrscheinlich wurde ein homogenes Kristallwachstum aufgrund zu hoher Flexibilität im Verbindungsstück zwischen dem Trx-Anhängsel und der C4BP Oligomerisierungsdomäne verhindert. (Daten nicht gezeigt)

Zweitens besteht die Möglichkeit, das Phasenproblem mittels multiplem isomorphem Ersatz zu lösen.<sup>176</sup> Hierbei werden während dem Kristallwachstum oder in den fertigen Kristall bspw. Schwermetallatome eingelagert. Geschieht dies ohne Veränderung des ursprünglichen Kristallgitters (isomorph) kann über den Vergleich des nativen mit dem isomorphen Datensatz das Phasenproblem gelöst werden. Im Fall des C4BP führte dieser Ansatz nicht zum Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Drittens kann das Phasenproblem mittels anomaler Streuung (MAD: *multi-wavelength anomalous dispersion* oder SAD: *single wavelength anomalous dispersion*) gelöst werden.<sup>179</sup> Bei diesen Methoden wird ähnlich dem isomorphen Ersatz eine artifizielle Bezugsquelle als Hilfsmittel im Proteinkristall verwendet. Beim SAD werden bspw. spezifisch alle Methionine zu der nichtkanonischen Aminosäure Selenomethionin ausgetauscht. Hierdurch werden die im Vergleich zu allen übrigen normalerweise in Proteinen vertretenen, relativ schweren Selenatome im Protein eingebaut. Durch Detektion des anomalen Signals an den Selenatomen kann dann das Phasenproblem gelöst werden. Mit dem Methionin-auxotrophen *E. coli* Stamm B834 (DE3) konnte zunächst das Wildtyp-Protein erfolgreich mit Selenomethionin-Markierung produziert werden. Die Struktur konnte trotzdem nicht gelöst werden, da sich zum einen die Auflösung nicht wesentlich verbesserte und sich zum anderen zu viele Selenatome in der heptameren Struktur befanden, um eine zweifelsfreie Zuordnung durchzuführen. Bis hierhin konnten mittels Röntgenstrukturanalyse keine Informationen über die Struktur der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne gewonnen werden. Immerhin wurden mit diesen



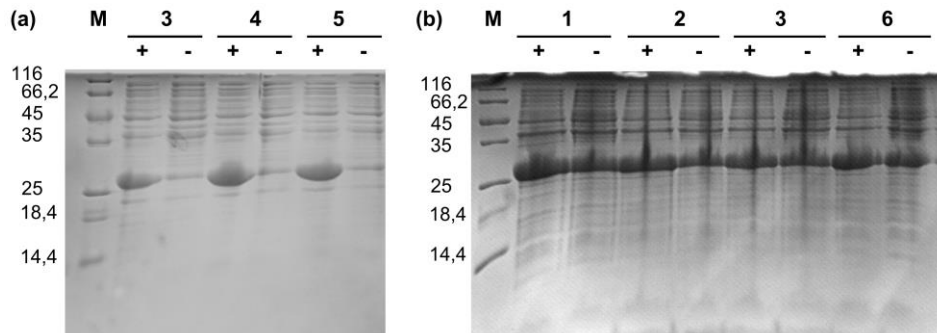
#### 4.1.3.1 Charakterisierung von Einzelklonen

Die *E. coli* Stämme Origami (DE3) und B834 (DE3) wurden mit dem Plasmid pET32a Trx C4BP

---

65

und die Zellen wurden in 15  $\mu$ L 1xPBS resuspendiert. Anschließend wurden die Proben zusammen mit jeweils 6  $\mu$ L Hoechst Puffer versetzt, 10 min bei 100 °C gekocht und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 14).



**Abb. 14:** SDS-PAGE mit den Proben des Expressionstests der ausgewählten Einzelklone. Induziert (+) und uninduziert (-) aufgetragen. **(a)** *E. coli* Origami (DE3) Einzelklone 3, 4 und 5 **(b)** *E. coli* B834 (DE3) Einzelklone 1, 2, 3 und 6. MW Trx-C4BP wt M2A M6A Monomer: 24,5 kDa.

Die Gelbilder in Abb. 14 zeigen die unterschiedlichen Expressionslevel der untersuchten Einzelklone. Der Origami (DE3) Einzelklon 4 aus Abb. 14 a wurde aufgrund der Bandenintensität für die weiteren Experimente ausgewählt. In dem Expressionstest mit Einzelklonen der C4BP wt M2A M6A Variante in B834(DE3) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Kulturen festgestellt werden. In der erwarteten Höhe von 24,5 kDa waren durchgehend die Banden des überexprimierten Proteins zu erkennen, daher wurde für die weiteren Experimente wahllos Einzelklon 1 ausgewählt (Abb. 14b). Die nichtinduzierten Kulturen der ausgewählten Einzelklone wurden zur Inokulation von 50 mL Kolben und Herstellung von Gefrierkulturen verwendet (3.1.4).

#### 4.1.4 SeMet markiertes C4BP

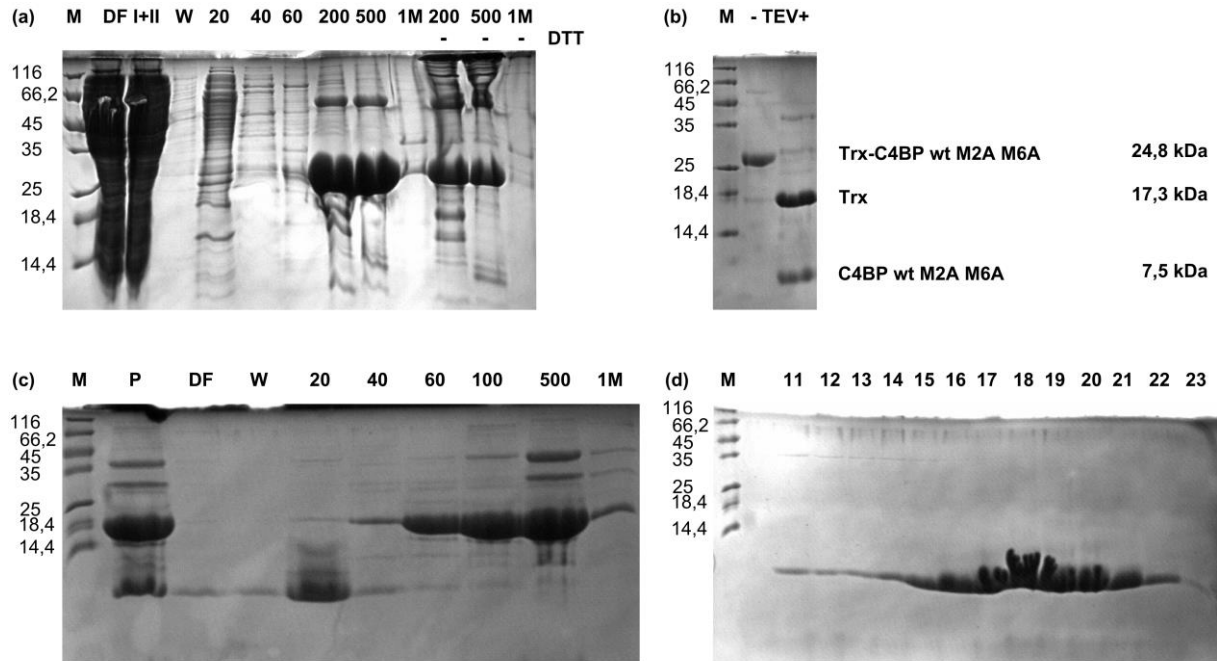
Für die Produktion von Selenomethionin-markiertem C4BP wt M2A M6A wurde der in 4.1.3.1 identifizierte Klon 1 verwendet. Hierzu wurden als Vorkultur 50 mL LB-Amp mit *E. coli* B834 (DE3) Trx-C4BP M2A M6A inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde 1 L LB-Amp mit der Übernachtskultur auf eine optische Dichte von 0,125 angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1 wurden die Zellen bei 6660 rpm und 4 °C pelletiert. Um die Zellen vom Vollmedium und somit von der Methioninquelle zu trennen, wurde das Pellet insgesamt dreimal in 100 mL gekühltem Wasser resuspendiert und pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 20 mL M9-Medium aufgenommen und in einen 2 L Kolben mit 1 L komplettiertem M9-Medium überführt. Zeitgleich wurde das Medium durch Zugabe von

---

Thiamin, Salzen, Glucose und Selenomethionin vervollständigt (2.9). Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mL einer 1 M IPTG-Lösung induziert und die Expression wurde für 3 Stunden bei 30 °C und 180 rpm aufrechterhalten. Im Anschluss erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation bei 6660 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Zellen in 7,5 mL 1x PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Insgesamt wurden nach diesem Protokoll 8 L SeMet-markiertes C4BP wt M2A M6A produziert, die chromatographische Reinigung erfolgte gemeinsam.

#### **4.1.4.1 Reinigung und Analyse**

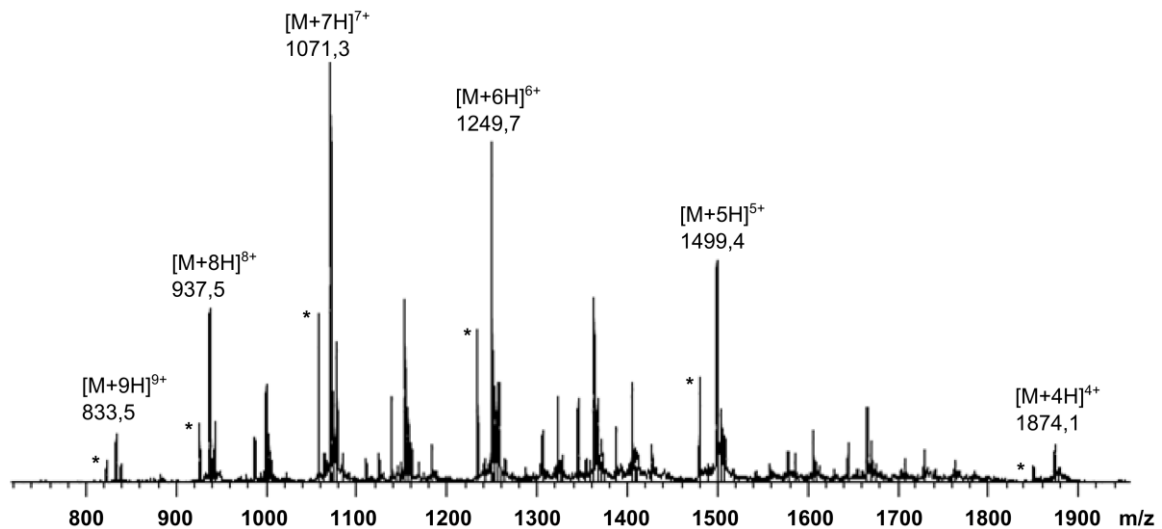
Die gefrorenen Pellets der gesammelten SeMet-markierten C4BP wt M2A M6A Produktionen wurden in einem Wasserbad aufgetaut und der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Passage durch eine French-Presse (3.2.5). Das Zelllysate wurde 20 min bei 15000 rpm und 4 °C pelletiert und der Überstand mit einem 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Die Reinigung des Zielproteins wurde nach der in Abb. 11 erläuterten Reinigungsstrategie durchgeführt. Eine erste chromatographische Reinigung erfolgte mittels zweier in Reihe montierter 1 mL HisTrap HP Säulen an einem FPLC *purifier* (Abb. 15 a). Das SeMet-markierte Trx-C4BP M2A M6A Fusionsprotein konnte hierbei über das 6His-Epitop an der Säulenmatrix immobilisiert und von einem Großteil der übrigen löslichen Proteine getrennt werden. Die Flussrate betrug 1 mL/min, die Elution erfolgte mittels eines Stufengradienten zunehmender Imidazolkonzentration.



**Abb. 15:** Übersicht der chromatographischen Reinigung von SeMet-markiertem C4BP wt M2A M6A. **(a)** Primäre Reinigung mittels IMAC. DF I+II: Durchfluss; W: Waschfraktion; Stufengradient: 20 mM, 40 mM, 60 mM, 200 mM, 500 mM und 1M Imidazol. Die Fraktionen 200 mM, 500 mM und 1M wurden auf den Spuren rechts außen zusätzlich ohne DTT aufgetragen. **(b)** Spaltung des SeMet-markierten Trx-C4BP wt M2A M6A Fusionsproteins mit TEV-Protease. Die Fraktionen 200 mM und 500 mM aus (a) wurden vereinigt, vor der Spaltung (-) nach Zugabe und Spaltung mit TEV-Protease (+); die Molekulargewichte sind rechts am Bildrand angegeben. **(c)** SDS-PAGE Analyse der mittels IMAC aufgetrennten TEV-Protease-Spaltung. P: Probe; DF: Durchfluss; W: Waschfraktion; Stufengradient: 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 500 mM und 1M: Imidazol. Die Fraktionen W und 20 mM wurden vereinigt, eingengt und über SEC gereinigt **(d)** SDS-PAGE Analyse der Fraktionen 11-23 der durchgeführten SEC (Säule: Superdex 75 pg 16/60), F15 bis F23 wurden vereinigt.

Der N-terminal fusionierte Faltungshelfer Thioredoxin wurde im Zuge der Reinigung von C4BP wt M2A M6A mittels TEV-Protease-Spaltung abgetrennt. Hierzu wurden die Fraktionen 200 mM und 500 mM der ersten IMAC vereinigt, mit TEV-Protease versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (3.2.12). Um den Grad der Spaltung abzuschätzen wurde eine SDS-PAGE der Reaktion angefertigt (Abb. 15 b). Die Spaltungsreaktion war annähernd vollständig daher wurde der komplette Ansatz für die Durchführung einer zweiten IMAC vorbereitet. Hierzu wurde zunächst durch Dialyse das von der ersten IMAC in der Probe verbliebene Imidazol abgereichert (3.2.10). Der Spaltansatz wurde hierzu in einen Dialyseschlauch überführt (12-14 kDa MWCO) und über Nacht in 5 L PBS bei 4 °C inkubiert. In einer zweiten IMAC wurden Trx-6His und TEV-Protease-6His von der Oligomerisierungsdomäne abgetrennt (Abb. 15c). Für eine abschließende chromatographische Reinigung mittels Größenausschlußchromatographie (Superdex 75 pg 16/60) wurden die Fraktionen W und 20 mM vereinigt und durch Ultrazentrifugation (Centricon, 10 kDa MWCO) auf ein Volumen von 1,5 mL eingengt. Die SEC wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Bei diesem Schritt wurde die Probe des Weiteren in 50 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,8 überführt. Das Protein eluierte in einem

symmetrischen Peak ca. 50 min nach Injektion und wurde in Fraktionen zu 1 mL gesammelt. Die Fraktionen F11 bis F23 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. (Abb. 15d). Die Fraktionen F15-F23 wurden vereinigt, was in einer Proteinkonzentration von 1,38 mg/mL und einer Gesamtausbeute von 12,4 mg resultierte. Der Austausch von Methionin zu Selenomethionin wurde mittels ESI-LCMS verifiziert, siehe Abb. 16. Neben dem SeMet-markierten Protein wurde hierbei ebenfalls die Met-Variante detektiert, da aufgrund des undichten Promotors bereits vor Zugabe von IPTG und SeMet das heterologe Fusionsprotein exprimiert wurde.



**Abb. 16:** ESI-LCMS Messung des SeMet-markierten hC4BP wt M2A M6A. Für die Messung von monomerem Protein wurde die Probe mit DTT versetzt. Met hC4BP: 7398,40 Da (berechnete Masse), SeMet hC4BP: 7492,19 Da (berechnete Masse), gemessene Masse: 7492,10 Da. Die beschrifteten Peaks stehen für vollständig SeMet-markiertes hC4BP wt M2A M6A Monomer. Die Peaks unmittelbar vor den beschrifteten bilden das Massenspektrum des unmarkierten Monomers, gekennzeichnet mit Asterisken (\*).

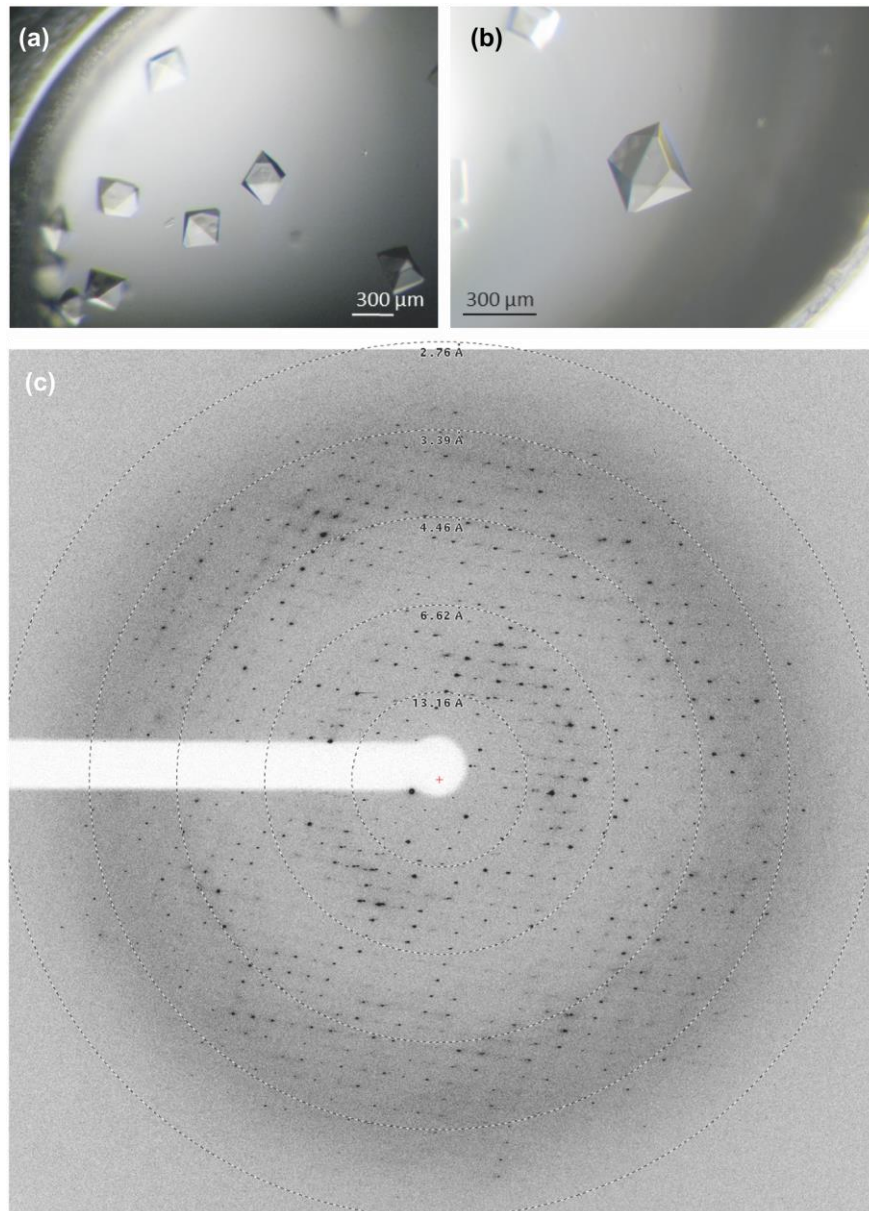
Das gereinigte Protein wurde à 1 mL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis per Übernachtexpress zur Kristallisation nach Braunschweig zu Händen von Dr. Stefan Schmelz, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung geschickt.

#### 4.1.5 Kristallisation

Auf der Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurde das kommerziell erhältliche JCSG I-IV Puffersystem durchmustert. Die Proteinlösung (6,8 mg/mL) wurde bei 15000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Durchmusterung der verschiedenen Pufferbedingungen wurde mit Hilfe eines Pipetierroboters (*Honeybee* 961 DIGILAB) realisiert. Die SeMet-markierte C4BP wt M2A M6A Mutante kristallisierte unter ähnlichen Bedingungen wie das Wildtypprotein. Die Kristallisationsbedingungen konnten soweit optimiert werden (46,5% (v/v) Polyethylenglycol 400, 5% (v/v) Methyl-2,4-Pentandiol, 0,1 M Tris, pH 7,3 und 13,7 mg/mL Proteinlösung), dass



nach wenigen Tagen bei 19 °C gut streuende ( $<3 \text{ \AA}$ ) Kristalle heranwuchsen (Abb. 17). Die Proteinkristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.



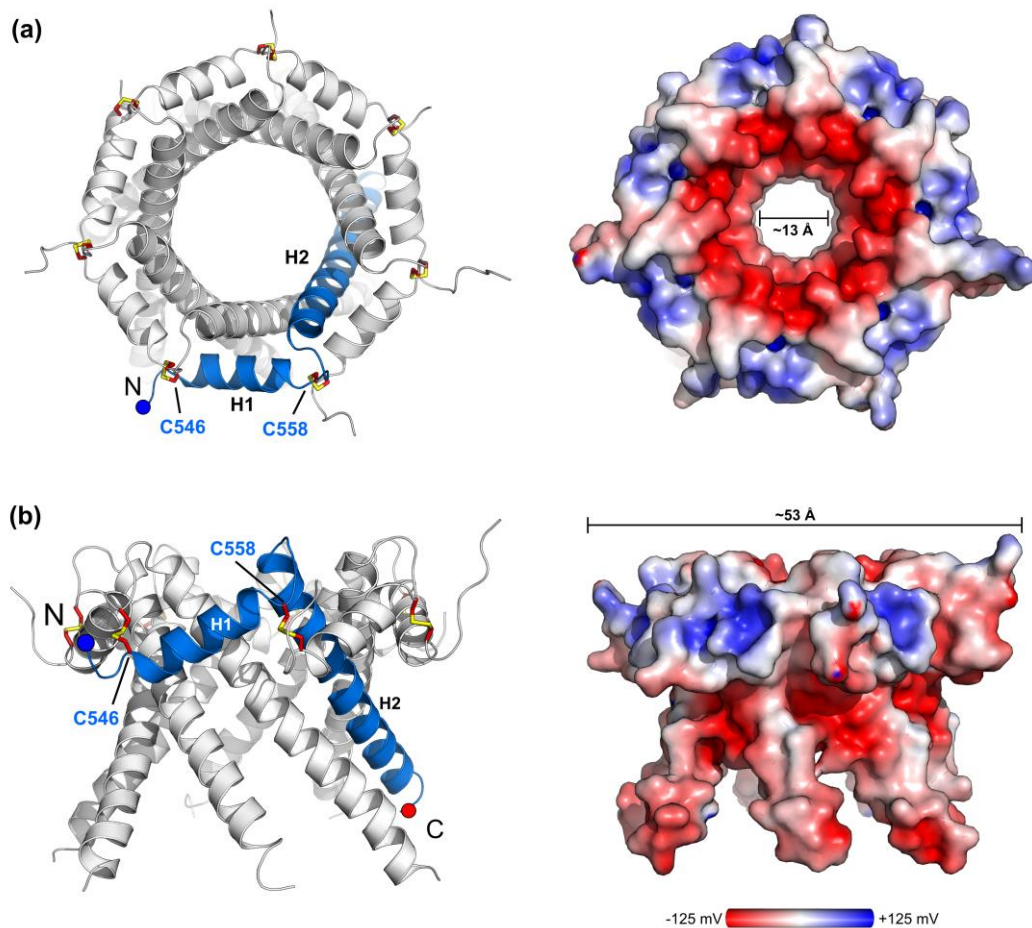
**Abb. 17:** Tetragonal bipyramidale SeMet C4BP M2A M6A Proteinkristalle (a) und (b). (Raumgruppe:  $P4_32_12$ ), ein 300  $\mu\text{m}$  Längenstandard ist jeweils an der unteren Bildkante eingeblendet. (c) Beugungsmuster des Proteinkristalls im Röntgenstrahl. Auflösung entlang der konzentrischen Kreise, von innen nach außen: 13,16  $\text{\AA}$ , 6,62  $\text{\AA}$ , 4,46  $\text{\AA}$ , 3,39  $\text{\AA}$  und 2,76  $\text{\AA}$ .

Ein hoch redundanter SAD-Datensatz konnte bei 100 K (-173,15 °C) an der BESSY MX-14.1 *Beamline* in Berlin mit 3,4  $\text{\AA}$  aufgenommen werden (Abb. 17 c). Diese Daten wurden verwendet, um die Positionen der Selenatome zu bestimmen, daraus die experimentellen Phasen abzuleiten

und nachfolgend ein Modell mit 2,8 Å Auflösung der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP zu erzeugen. Dies erfolgte mit spezieller Software (XDS/XSCALE,<sup>180</sup> PHENIX suite,<sup>181</sup> Coot<sup>182</sup>) und wurde von Dr. Stefan Schmelz am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt.

#### 4.1.6 Beschreibung der Struktur

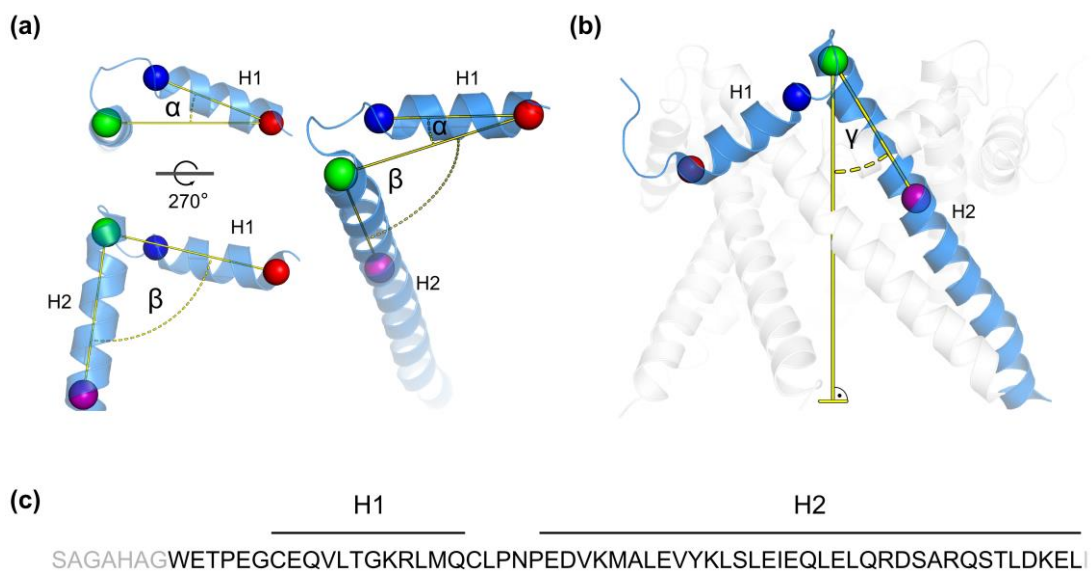
Die heptamere Struktur der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP (Aminosäuren 540 - 597) kann in der Aufsicht als torusförmig und in der Seitenansicht als champagnerkorkenförmig beschrieben werden (Abb. 18).



**Abb. 18:** Struktur der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne der 7 $\alpha$ -Isoform des humanen C4BP. Auf der linken Seite ist die Sekundärstruktur und auf der rechten Seite das elektrostatische Oberflächenpotenzial dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung ist ein Monomer blau hervorgehoben; die Positionen der Cysteine (C546 und C558) und Sekundärstrukturelemente (H1 und H2) sind beschriftet. Der N-Terminus ist mit einem blauen und der C-Terminus mit einem roten Kreis gekennzeichnet. (a) In der Aufsicht zeigt die heptamere Oligomerisierungsdomäne eine torusförmige Architektur. Der innere und äußere Durchmesser beträgt 13 Å bzw. 53 Å. (b) In der Seitenansicht zeigt die Oligomerisierungsdomäne eine charakteristische champagnerkorkenförmige Silhouette. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)



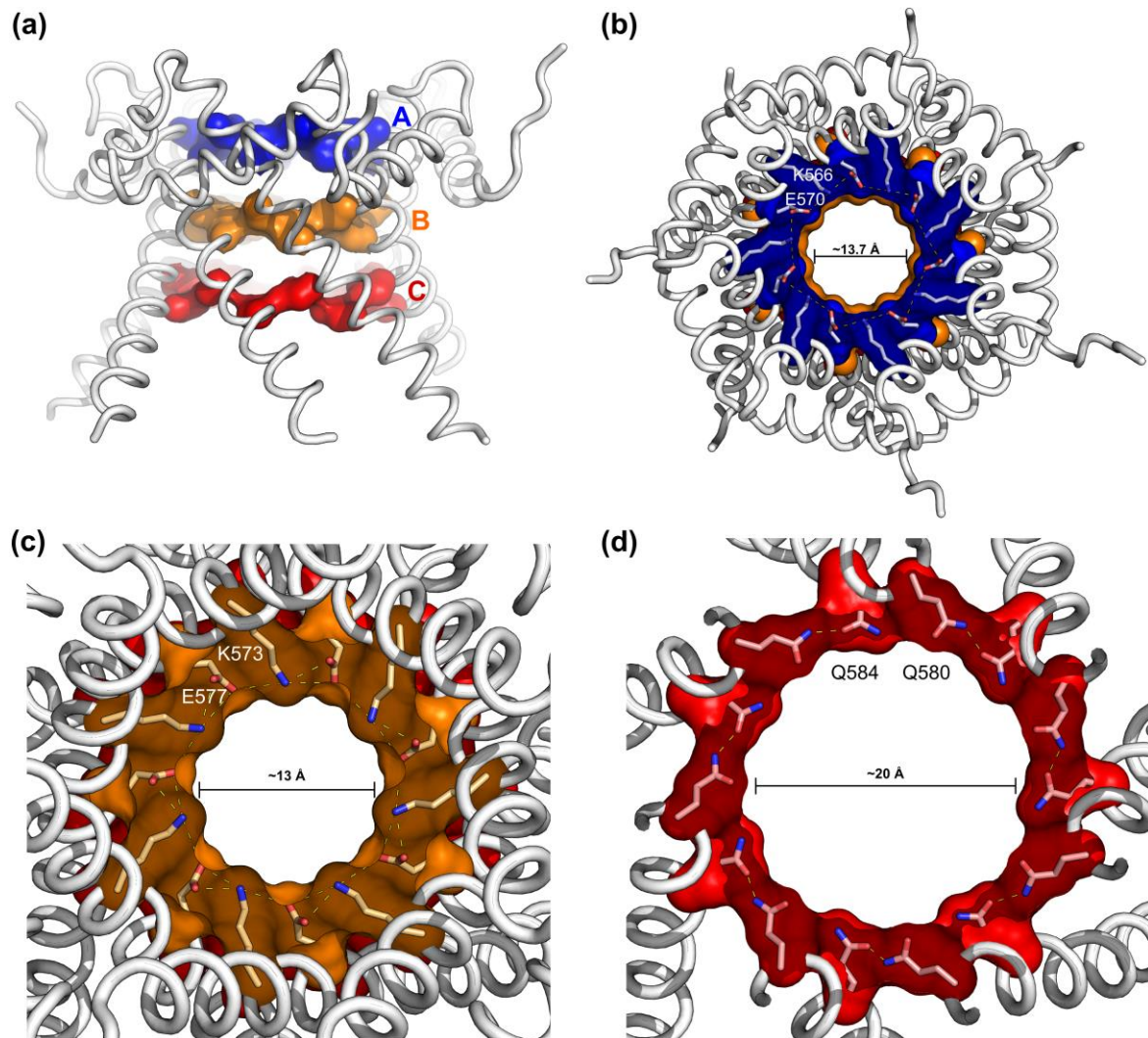
Der innere und äußere Durchmesser des Rings beträgt 13 Å beziehungsweise 53 Å. Diese Daten decken sich mit den elektronenmikroskopischen Messungen von Dahlbäck *et al.* aus dem Jahr 1980 die für die beiden Durchmesser 13 Å und 60 Å angaben.<sup>183</sup> Eine monomere hC4BP Untereinheit lässt sich durch eine kurze N-terminale Helix H1 (Aminosäuren: 545 - 557) und eine längere C-terminale Helix H2 (Aminosäuren: 562 - 597) beschreiben. Verbunden sind die beiden Helices über einen beweglichen, 5 Aminosäuren langen Abstandshalter der Sequenz CLPNP. Durch die beiden Proline in *trans*-Konformation werden die beiden Helices H1 und H2 in einem Winkel von 86,09° zu einander angeordnet (Abb. 19).



**Abb. 19:** Übersicht zu der Geometrie der Sekundärstrukturelemente eines C4BP-Monomers. (a) Auf-, Seiten- und Profilsicht eines C4BP Monomers zur Veranschaulichung der Neigungswinkel  $\alpha$  und  $\beta$ . (b) Ein Monomer (blau) im Kontext der Oligomerisierungsdomäne (grau), um den Neigungswinkel  $\gamma$  im Bezug zur vertikalen Symmetrieachse zu veranschaulichen. (c) Aminosäuresequenz eines M2A M6A hC4BP-Monomers die Positionen der beiden Helices H1 und H2 sind darüber angegeben, zusätzliche Aminosäuren sind in grau dargestellt. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Die beiden Winkel  $\alpha$  und  $\beta$  beschreiben die Neigungswinkel der beiden Helices zueinander, der Winkel  $\gamma$  gibt die Neigung der längeren C-terminalen Helix H2 relativ zur Symmetrieachse des Heptamers wieder (Abb. 19 a und b). Bei der 7 $\alpha$  Isoform des hC4BP betragen die Winkel  $\alpha$  20,3 $\pm$ 0,7°,  $\beta$  86,1 $\pm$ 1,6° und der durchschnittliche Neigungswinkel  $\gamma$  37,1 $\pm$ 1,1°. Die beiden Cysteine befinden sich am Anfang (Cys546) beziehungsweise am Ende (Cys558) von Helix H1 (Abb. 19 c). Jedes Monomer ist über zwei Disulfidbrücken mit den beiden benachbarten Monomeren verknüpft. Die so verbundenen Helices H1 erscheinen hierdurch wie ein kontinuierlicher Ring, welcher die Helices H2 umschließt, ähnlich einem Fassreifen der die Fassdauben fixiert (Abb. 18). Das elektrostatische Oberflächenpotenzial der Torusinnenseite

(Glu563 und Glu570) ist negativ geladen, die Außenseite ist neutral (Abb. 18). Neben den bereits erwähnten Disulfidbrücken kann die Stabilisierung des C4BP Komplexes durch Schichten intermolekularer Bindungen entlang der vertikalen Achse des Oligomers veranschaulicht werden (Abb. 20).



**Abb. 20:** Darstellung der stabilisierenden Ringe aus intermolekularen Interaktionen welche die Oligomerisierungsdomäne des hC4BP stabilisieren. **(a)** Übersicht: die Oligomerisierungsdomäne ist als Cartoon abgebildet, für die drei Ringe wurde die Oberflächendarstellung gewählt. Die Ringe 1, 2 und 3 sind in den Farben Blau, Orange und Rot und mit A, B und C gekennzeichnet. **(b)** Aufsicht auf den ersten stabilisierenden Ring geformt von K566 und E570 (blau), die relevanten Aminosäurereste sind im Stäbchenmodell dargestellt, gelb gestrichelte Linien illustrieren die ionischen Wechselwirkungen; der Ringinnendurchmesser beträgt etwa 13,7 Å. **(c)** Aufsicht auf den zweiten stabilisierenden Ring ionischer Bindungen zwischen den Resten K573 und E577 (orange), Durchmesser ca.: 13 Å. **(d)** Aufsicht auf den dritten stabilisierenden Ring (rot) bestehend aus Wasserstoffbrückenbindungen, ausgebildet zwischen den Resten Q580 und Q584; der Ringdurchmesser beträgt ca. 20 Å. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Von oben nach unten sind dies zwei Schichten ionischer Wechselwirkungen zwischen Lys566 und Glu570 sowie Lys573 und Glu577 gefolgt von einer Schicht Wasserstoffbrückenbindungen

zwischen Gln580 und Gln584. Zusätzlich sind auf der Außenseite Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyr572 und Glu582 zu finden, die ähnlich einer Klammer den unteren Teil des Oligomers stabilisieren und ebenfalls einen Beitrag zur Gesamtstabilität leisten. Insgesamt bildet jedes Monomer durchschnittlich 54 Kontakte, wie zum Beispiel hydrophobe Interaktionen, aus (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Zusammenstellung der Interaktionsflächen einzelner Monomere **(a)** und der Monomere im assemblierten Heptamer **(b)**. Die statistischen Daten wurden mit dem Programm PDBePisa generiert.<sup>184</sup>

**(a)**

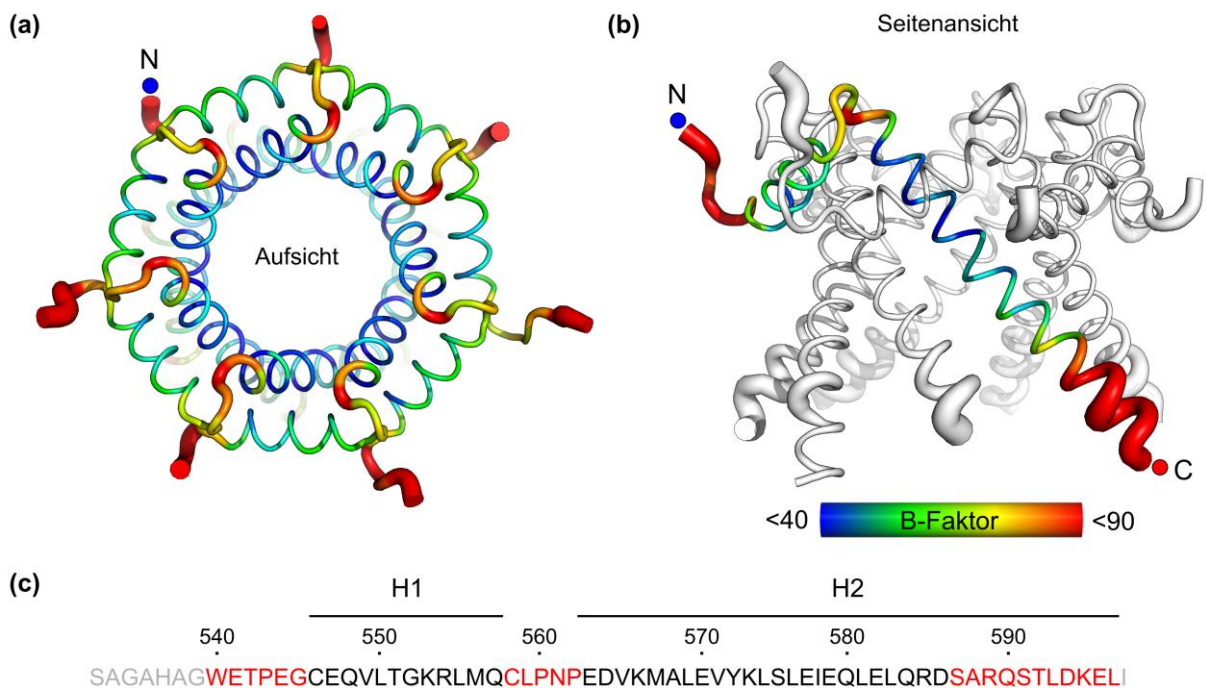
Kette 1	Kette 2	Anzahl der Kontakte	Kontaktfläche (Å <sup>2</sup> )
A	C	41	969
A	F	71	1002
B	D	50	969
B	G	49	958
C	E	49	998
D	F	53	947
E	G	66	1041
Ø		54,1	983
STDEV		10,0	22

**(b)**

Kette	Oberfläche (Å <sup>2</sup> )	Vergrabene Bereiche (Å <sup>2</sup> )
A	5434	2164
B	5267	2155
C	4780	2194
D	5330	2100
E	5212	2210
F	5088	2156
G	5522	2197
Ø	5233	2168
STDEV	245	37

Jedes Monomer hat eine Gesamtoberfläche von 5200 Å<sup>2</sup>, von der durchschnittlich 980 Å<sup>2</sup> als Kontaktfläche zu einem benachbarten Monomer dienen. In dem komplett assemblierten Ring sind durchschnittlich 42% (2168 Å<sup>2</sup>) einer Monomeroberfläche verborgen (Tabelle 15). Die Summe der aufgeführten Wechselwirkungen und Bindungen sind essenziell für die Ausbildung des Torus und der charakteristischen Form der Oligomerisierungsdomäne des hC4BP.

Die gefundene Kristallstruktur stellt eine Momentaufnahme dar, dennoch kann über die B-Faktoren ein Maß für die molekulare Beweglichkeit angegeben werden. In der Struktur des assemblierten hC4BP wurden drei Bereiche mit erhöhter molekularer Beweglichkeit identifiziert. Diese sind der N-terminale Linker (AS: 540 - 545), der Linker zwischen Helix H1 und H2 (AS: 558 - 562) sowie das C-terminale Ende von Helix H2 (AS: 587 - 597). In diesen Regionen erreichen die B-Faktoren Werte in Höhe des doppelten Durchschnitts (Abb. 21). Der rigideste Bereich befindet sich in dem Teil von Helix H2 in welchem sich die weiter oben aufgeführten stabilisierenden Schichten befinden (AS: 565 - 579). Ebenfalls relativ unbeweglich ist der mittlere Teil von Helix H1 der zu beiden Seiten von den intermolekularen Disulfidbrücken flankiert wird.



**Abb. 21:** Darstellung der B-Faktoren entlang des Proteinrückgrats, (a) Aufsicht, (b) Seitenansicht; blaue dünne Abschnitte symbolisieren Bereiche geringer Beweglichkeit, dicke rote Abschnitte Bereiche erhöhter molekularer Beweglichkeit (siehe Legende). Die N- und C-Termini (blaue und rote Kreise) stellen die Bereiche erhöhter atomarer Beweglichkeit dar. (c) Sequenz des hC4BP, die Positionen der Helices H1 und H2 sind über der Sequenz angegeben, Bereiche erhöhter molekularer Beweglichkeit sind rot hervorgehoben, zusätzliche Aminosäuren sind in grau dargestellt. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

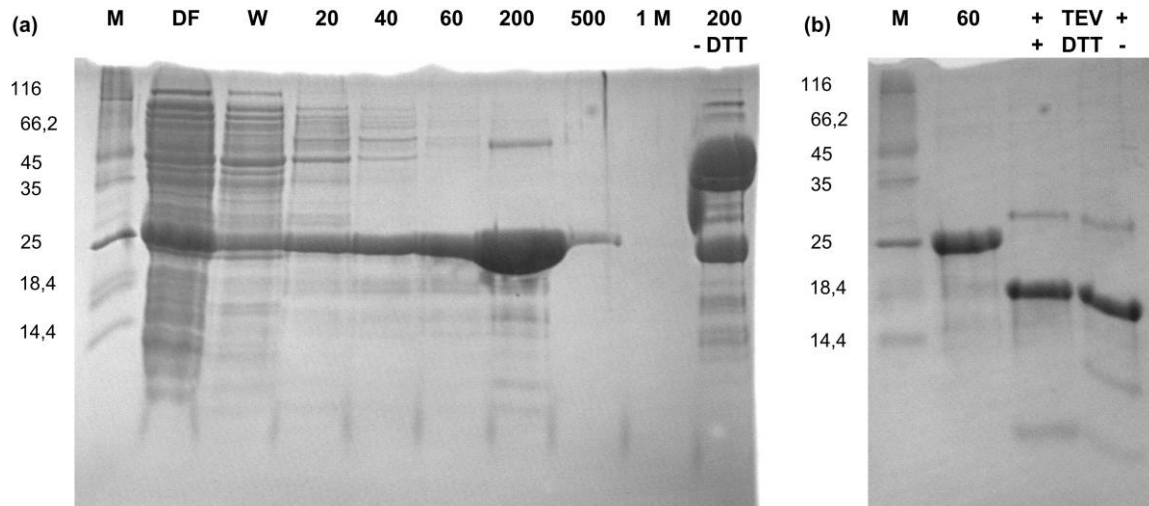
---

Zwei der vier beschriebenen Isoformen des hC4BP sind Heterooligomer und enthalten zusätzlich zu den  $\alpha$ -Ketten noch eine  $\beta$ -Kette. Bereits in der allerersten Publikation, in der die C-terminale Oligomerisierungsdomäne als Grundgerüst zur Präsentation biologisch aktiver Peptide und Proteine vorgestellt wurde, ist der Gedanke aufgekommen, durch eine Koexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette stöchiometrisch definierte Heterooligomere zu erzeugen.<sup>63</sup> Im Folgenden werden die Produktion der  $\beta$ -Kette sowie erste Versuche einer heterooligomeren *in vitro* Assemblierung beschrieben (4.1.7 und 4.1.8). Abschließend werden basierend auf der Kristallstruktur der 7 $\alpha$ -Isoform und MD-Simulationen Vorschläge zur Organisation der drei übrigen Isoformen gegeben (4.1.9).

#### 4.1.7 C4BP $\beta$ -Kette

Zur Untersuchung der  $\beta$ -Kette wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen sollte das gesamte Protein (3 CCPs und Oligomerisierungsdomäne) produziert werden (AS: 1 - 251) zum anderen nur die Aminosäuresequenz der potentiellen Oligomerisierungsdomäne solitär (AS: 191 - 251). Die komplette codierende Sequenz (Unigene ID: 99886) wurde bei der Firma imaGenes (GenomeCube) gekauft und als Stichkultur in *E. coli* DH10B auf dem Plasmid pDNR-LIB geliefert. Parallel hierzu wurde die codierende Sequenz der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne der humanen C4BP  $\beta$ -Kette mittels rekursiver PCR generiert.<sup>185</sup> Hierfür wurde zunächst die Basenabfolge der letzten 61 Aminosäuren in den *E. coli codon usage* übersetzt, auf sechs Oligonukleotide mit den entsprechenden Überhängen zerlegt und schließlich in drei PCR-Reaktionen zusammengefügt. Die Expression erfolgte als Thioredoxininfusion in *E. coli* Origami (DE3), siehe Abb. 22.





**Abb. 22:** Reinigung des Trx-C4BP $\beta$  191-261-Fusionsproteins. **(a)** SDS-PAGE mit den Fraktionen der IMAC-Reinigung einer 1 L-Produktion. Auf der Spur rechts außen wurde die 200 mM Fraktion ohne DTT im Auftragspuffer aufgetragen. **(b)** Die 60 mM-Fraktion aus (a) wurde mit TEV-Protease gespalten und mit bzw. ohne DTT aufgetragen. Das ungespaltene Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 24,4 kDa, Fragmente nach der Spaltung mit TEV-Protease: Trx mit 17,1 kDa und  $\beta$ -Kette C4BP 7,3 kDa. Die Bande bei ca. 27 kDa entspricht dem MW der verwendeten TEV-Protease.

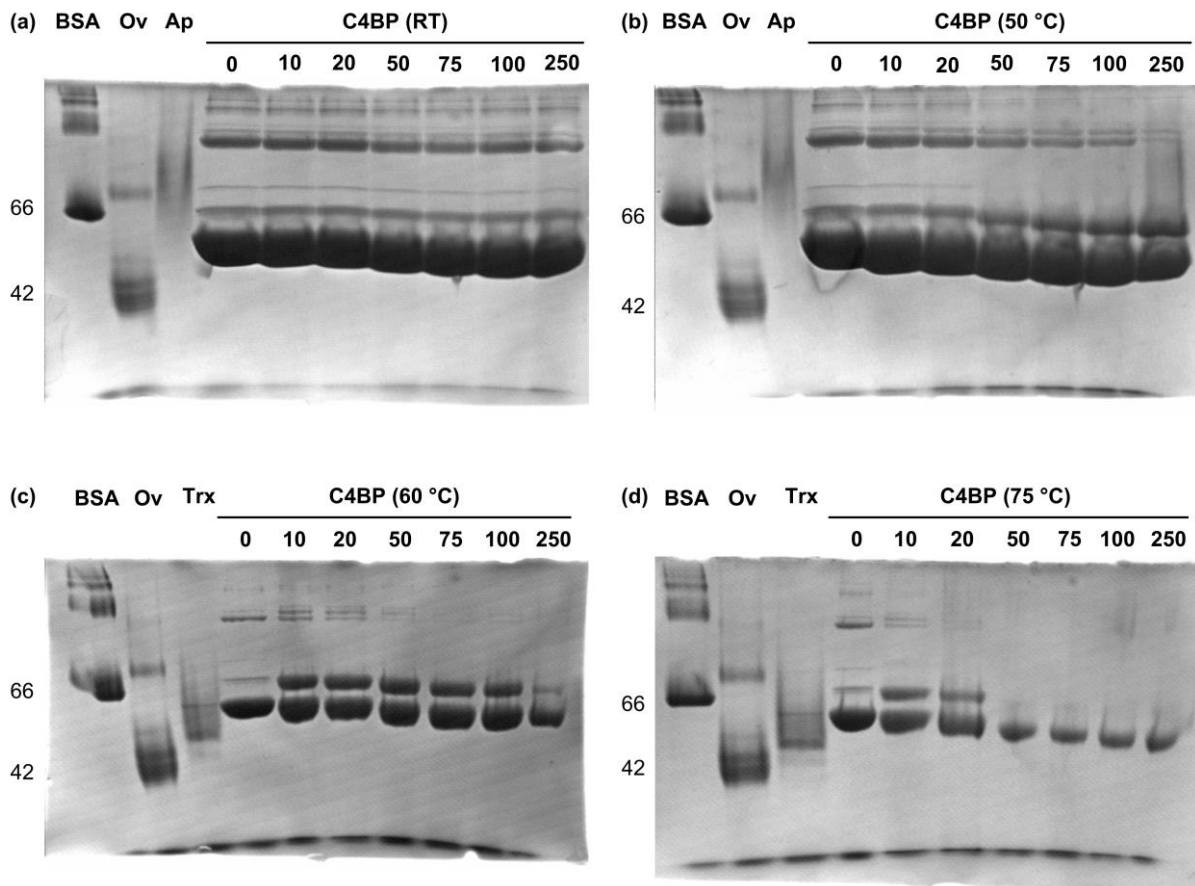
Das Trx-C4BP $\beta$  191-261-Fusionsprotein scheint zur Ausbildung von Dimeren in der Lage zu sein, siehe Abb. 22 a, letzte Spur rechts außen (Dimer: 48 kDa). Nach der vollständigen Spaltung der C4BP $\beta$ -Oligomerisierungsdomäne vom Thioredoxin (Abb. 22 b) ist in der Spur ohne DTT eine Bande in Höhe von ca. 14 kDa zu erkennen. Die Assemblierung höherer Oligomere konnte nicht beobachtet werden, dies steht in Einklang mit dem physiologischen Kontext der  $\beta$ -Kette, wonach diese nur als Heterooligomer mit sechs bzw. sieben  $\alpha$ -Ketten auftritt. Aus diesem Grund ist die hier beobachtete Dimerisierung als experimentelles Artefakt zu werten.

Eine lösliche Expression der gesamten  $\beta$ -Kette (AS: 1 - 251) war nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Das Fusionsprotein bestehend aus Thioredoxin und der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne der  $\beta$ -Kette konnte dagegen mit Ausbeuten im knapp zweistelligen mg/L-Bereich produziert werden.

#### 4.1.8 Denaturierung und Renaturierung

In ersten Experimenten wurde versucht, das C4BP Heptamer mit steigenden DTT-Konzentrationen und Hitze zu denaturieren (Abb. 23). Die Proben wurden präpariert und für 3 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Mittels BN-PAGE wurde im Anschluss der Grad der Denaturierung abgeschätzt (3.2.7). Als Vergleichsproteine wurden Bovine Serum Albumin (BSA), Ovalbumin (Ov), Thioredoxin (Trx) und Aprotinin (Ap) verwendet. BSA und Ov eigneten sich gut als Vergleichsproteine, da sie mit Molekulargewichten von 66 kDa bzw. 44 kDa oberhalb

bzw. unterhalb des C4BP-Heptamers (52 kDa) laufen. Als Vergleichsstandard für monomerisiertes C4BP (7,5 kDa), wurde zunächst Ap später Trx eingesetzt. Beide Proteine zeigten allerdings in der BN-PAGE kein ihrem MW entsprechendes Laufverhalten bzw. waren aufgrund ihrer geringen Größe lediglich in der Lauffront des Kathodenpuffers zu detektieren.

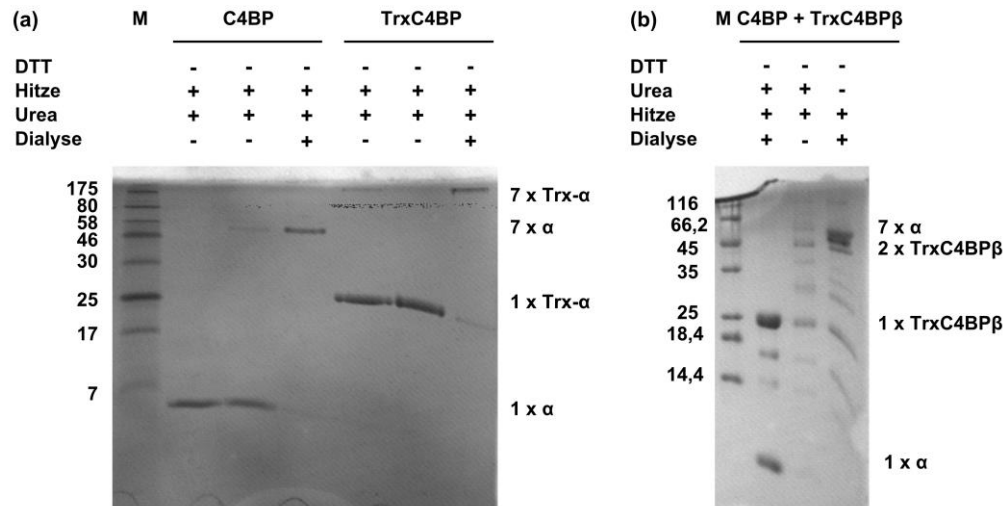


**Abb. 23:** BN-PAGEs der ersten Denaturierungsversuche mit C4BP (3 mg/mL). Das Protein wurde mit steigenden Konzentrationen DTT (0–250 mM) versetzt und 3 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert: **(a)** RT, **(b)** 50 °C, **(c)** 60 °C und **(d)** 75 °C. Molekulargewichte der verwendeten Proteine: Bovine Serum Albumin: 66 kDa, Ovalbumin: 42 kDa, Thioredoxin: 17 kDa, Aprotinin: 6,5 kDa, C4BP: 52 kDa.

Mit zunehmend extremeren Bedingungen ist eine Denaturierung der Oligomerisierungsdomäne zu beobachten. Die Intensität der Hauptbande zwischen BSA und Ov nimmt ab und gleichzeitig akkumulieren kleinere Proteine in der Lauffront des Kathodenpuffers am unteren Gelrand. Trotz sehr harscher Präparationsbedingungen der Proben konnte keine vollständige Denaturierung des Heptamers beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die folgenden Experimente bei denen die gefundenen Eigenschaften für eine *in vitro* Assemblierung von Heterooligomeren genutzt werden sollten (Abb. 24). Hierzu wurden zunächst mit C4BP $\alpha$  bzw. Trx-hC4BP $\alpha$  einzeln die Bedingungen für

eine vollständige Denaturierung und Renaturierung der Homooligomere ermittelt. Im Anschluss sollte durch gemeinsame Denaturierung von C4BP $\alpha$  und TrxC4BP $\beta$  und anschließender Renaturierung die Generierung von Heterooligomeren untersucht werden.



**Abb. 24:** (a) Denaturierung und Rückfaltung von hC4BP $\alpha$  bzw. Trx-hC4BP $\alpha$ . Die Proben wurden mit 10 mM DTT und 0,5 M Urea gemischt und 5 min bei 100 °C inkubiert. Die beiden Proteine wurden jeweils wie folgt aufgetragen: direkt nach dem Aufkochen, Inkubation über Nacht bei RT bzw. Dialyse über Nacht gegen PBS. Alle Proben wurden vor dem Auftrag auf das SDS-Gel mit Auftragspuffer (8 M Urea, kein DTT) gemischt und für 10 min bei 100 °C inkubiert. (b) Dieses Gel zeigt einen Versuch aus C4BP $\alpha$ -Ketten und TrxC4BP $\beta$ -Heterooligomere zu erzeugen. C4BP 7 $\alpha$ -Kette und TrxC4BP $\beta$  wurden in gleicher Konzentration gemischt (jeweils 0,1 mg/mL). Probenvorbereitung siehe (a). Die erste Probe wurde über Nacht bei RT inkubiert, die zweite wurde dialysiert. Die Kontrolle in Spur drei wurde weder mit DTT noch mit Urea behandelt, aber dialysiert. Banden zwischen den beschrifteten Proteinbanden entsprechen Abbauprodukten von TrxC4BP $\beta$  (Spur 1) bzw. unvollständigen C4BP $\alpha$ -Heptameren. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

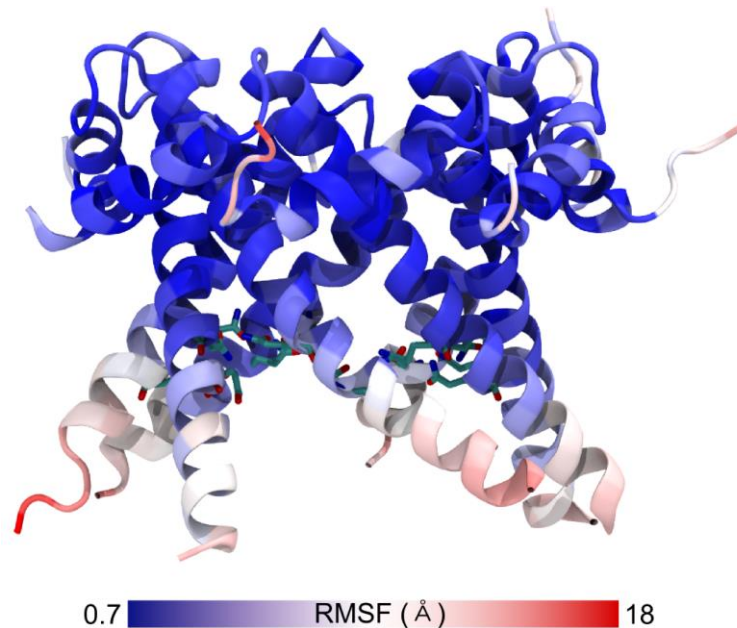
Nach dem Entfernen der denaturierenden Agentien mittels Dialyse über Nacht konnten sowohl für das TEV-Protease gespaltene C4BP als auch für das Fusionsprotein TrxC4BP definierte Oligomere nachgewiesen werden, siehe Abb. 24 (a). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde versucht, mit derselben Methode aus C4BP und TrxC4BP $\beta$  Heterooligomere zu erzeugen, siehe Abb. 24 (b). Der Nachweis von Heterooligomeren wurde durch Abbauprodukte der  $\beta$ -Kette und unvollständige C4BP $\alpha$ -Heptamere erschwert und konnte nicht gebracht werden. Western Blot-Analysen zur Detektion des His-Epitop am TrxC4BP $\beta$  (nicht gezeigt) führten ebenfalls nicht zu einem eindeutigen Ergebnis.

#### 4.1.9 MD-Simulationen: *in silico* Assemblierung der C4BP-Isoformen

Für eine nähere Untersuchung der intermolekularen Wasserstoff- und Salzbrücken wurde zunächst von Matteo T. Degiacomi (*Institute of Bioengineering, École Polytechnique Fédérale de*



Lausanne, Lausanne, Schweiz) mit dem Modell der 7 $\alpha$  Isoform eine 100 ns Molekulardynamik-Simulation durchgeführt (Abb. 25).



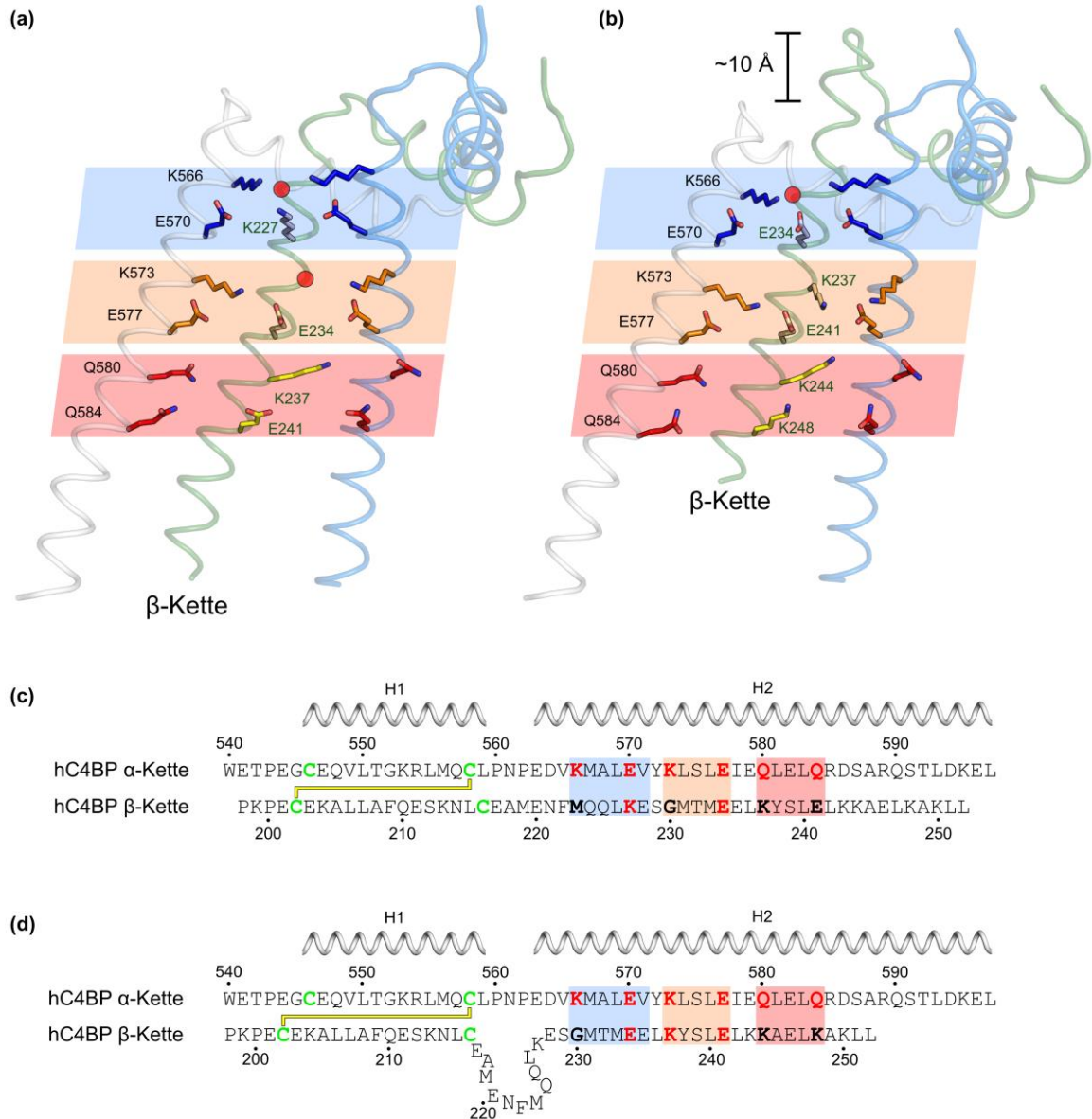
**Abb. 25:** Root Mean Square Fluctuation (RMSF) Darstellung des hC4BP 7 $\alpha$  Heptamers während einer 100 ns dauernden MD-Simulation. Die Aminosäurereste Glu580 und Glu584 (stabilisierender Ring aus Wasserstoffbrückenbindungen, siehe 4.1.6 Abb. 20) sind im Stäbchenmodell gezeigt. In Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten B-Faktoren scheint auch in der Simulation der C-terminale Bereich von Helix H2 (unterhalb von Glu584) eine erhöhte Flexibilität aufzuweisen. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41)</sup>)

Die Auswertung ergab, dass zu jedem Zeitpunkt der Simulation im oberen Ring (Lys566 und Glu570) drei und im mittleren Ring (Lys573 und Glu577) eine Salzbrücke ausgebildet sind. Durchschnittlich waren die Bindungen im oberen Ring zu  $42,9 \pm 3,7\%$  und im mittleren Ring  $45,0 \pm 7,2\%$  über den Zeitraum der Simulation etabliert. Die Häufigkeit dieser Interaktionen trägt daher signifikant zur Gesamtstabilität der Oligomerisierungsdomäne bei.

In ähnlicher Weise wurden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gln580 und Gln584 bzw. Tyr572 und Glu582 untersucht. Die Bindungen zwischen Gln580 and Gln584 konnten hierbei lediglich in  $3,9 \pm 1,8\%$  von 100 ns beobachtet werden. Der Beitrag zur Gesamtstabilität scheint hier eine untergeordnete Rolle zu spielen. Möglicherweise führen diese Bindungen zu einer Art Dämpfungseffekt, um den C-terminalen Bewegungen von H2 entgegenzuwirken. Die *in silico* gezeigte geringe Abundanz/ Relevanz der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gln580 and Gln584 ist konsistent mit experimentellen Daten aus der Literatur über C-terminal verkürzte Varianten, die auch ohne diesen Bereich in der Lage sind zu oligomerisieren (4.2.2).<sup>42</sup> Dieser Bereich der Oligomerisierungsdomäne wird in Abschnitt 4.2.2 weiter untersucht. Bindungen zwischen Tyr572 und Glu582 scheinen mit durchschnittlich  $9,5 \pm 4,8\%$  von 100 ns nur geringfügig häufiger aufzutreten.

---

Ausgehend von der 7 $\alpha$ -Struktur wurden *in silico* Modelle der Oligomerisierungsdomänen der drei übrigen bekannten C4BP-Isoformen (6 $\alpha$ , 6 $\alpha$ 1 $\beta$ , und 7 $\alpha$ 1 $\beta$ ) erstellt. Alle *in silico*-Modelle wurden energieminiert, um sterische Hinderung so gering wie möglich zu halten. Einem ersten Modell wurde ein Alignment der Aminosäuren 220 - 252 der  $\beta$ -Kette mit den Aminosäuren der Helix H2 der  $\alpha$ -Kette (563 - 595) zugrunde gelegt. In dieser Anordnung wurden allerdings die weiter oben bereits diskutierten Ringe nicht bzw. nur schlecht aufrechterhalten (Abb. 26 a und c). Diese intermolekularen Interaktionen können wahrscheinlich besser ausgebildet werden, wenn H2 der  $\beta$ -Kette um 7 Aminosäuren im Vergleich zur  $\alpha$ -Kette nach oben verschoben wird. In dieser Position sind E234 und K237/E241 der  $\beta$ -Kette in der Lage, mit den salzbrückenausbildenden Schichten K566/E570 und K573/E577 der  $\alpha$ -Ketten zu interagieren (Abb. 26 b und d). Durch diese Verschiebung müssten Teile der  $\beta$ -Kette (AS 217-225) ca. 10 nm aus der übrigen Oberfläche herausragen, um die Cysteine der Helix H1 in die Lage zu versetzen, mit den benachbarten  $\alpha$ -Ketten Disulfidbrücken auszubilden.



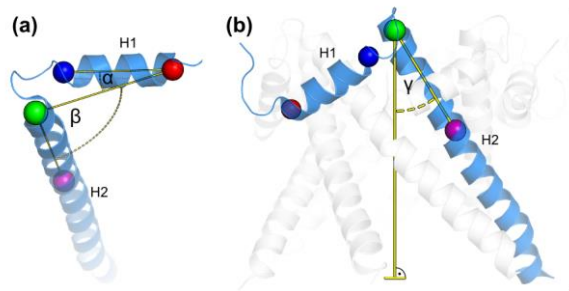
**Abb. 26:** Übersicht der möglichen Interaktionen der  $\beta$ -Kette mit den benachbarten  $\alpha$ -Ketten bei der Ausbildung von Heterooligomeren. **(a)** Ausgangsmodell der  $\beta$ -Kette (grün) zwischen zwei benachbarten  $\alpha$ -Ketten (silber-farben und blau). Die  $\beta$ -Kette wurde so modelliert, dass Helix H2 sich vollständig in dem entstehenden Ring einfügt. Bei diesem Modell werden die drei stabilisierenden Schichten (blau, orange und rot) zerstört, fehlende Interaktionen sind mit roten Kreisen markiert. Aminosäurereste der  $\alpha$ -Ketten, die noch in der Lage sind zur intermolekularen Stabilität beizutragen, sind in den Farben der entsprechenden Schichten dargestellt. **(b)** Optimierte Modell der  $\beta$ -Ketten-Positionierung, um eine maximale Anzahl an Interaktion in den stabilisierenden Schichten zu gewährleisten. In diesem Modell ragt die  $\beta$ -Kette ca. 10 Å über die ursprüngliche Oberfläche der Oligomerisierungsdomäne hinaus. Hierdurch kann jedoch der zweite stabilisierende Ring durch K237 und E241 der  $\beta$ -Kette aufrechterhalten werden. **(c)** Sequenzalignment der Oligomerisierungsdomänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette nach dem in (a) vorgeschlagenen Modell. **(d)** Sequenzalignment der optimierten Positionierung der  $\beta$ -Kette nach dem Modell in (b). Aminosäurereste welche bei der Ausbildung ( $\alpha$ -Kette) und Aufrechterhaltung ( $\beta$ -Kette) der stabilisierenden Schichten beteiligt sind, wurden rot dargestellt. Die stabilisierenden Schichten sind farblich hervorgehoben wie in (a) und (b). (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

In beiden vorgeschlagenen Modellen aus Abb. 26 wird der Ring aus Wasserstoffbrückenbindungen nicht aufrechterhalten. Eine Übersicht zu den Winkeln  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ,

welche die Geometrie der Monomere in den entsprechenden Isoformen beschreiben, ist in Tabelle 16 aufgeführt. Zur besseren Orientierung ist unter Tabelle 16 eine Übersicht zu den Positionen der Winkel am Monomer bzw. im Oligomer gegeben (Abb. 27).

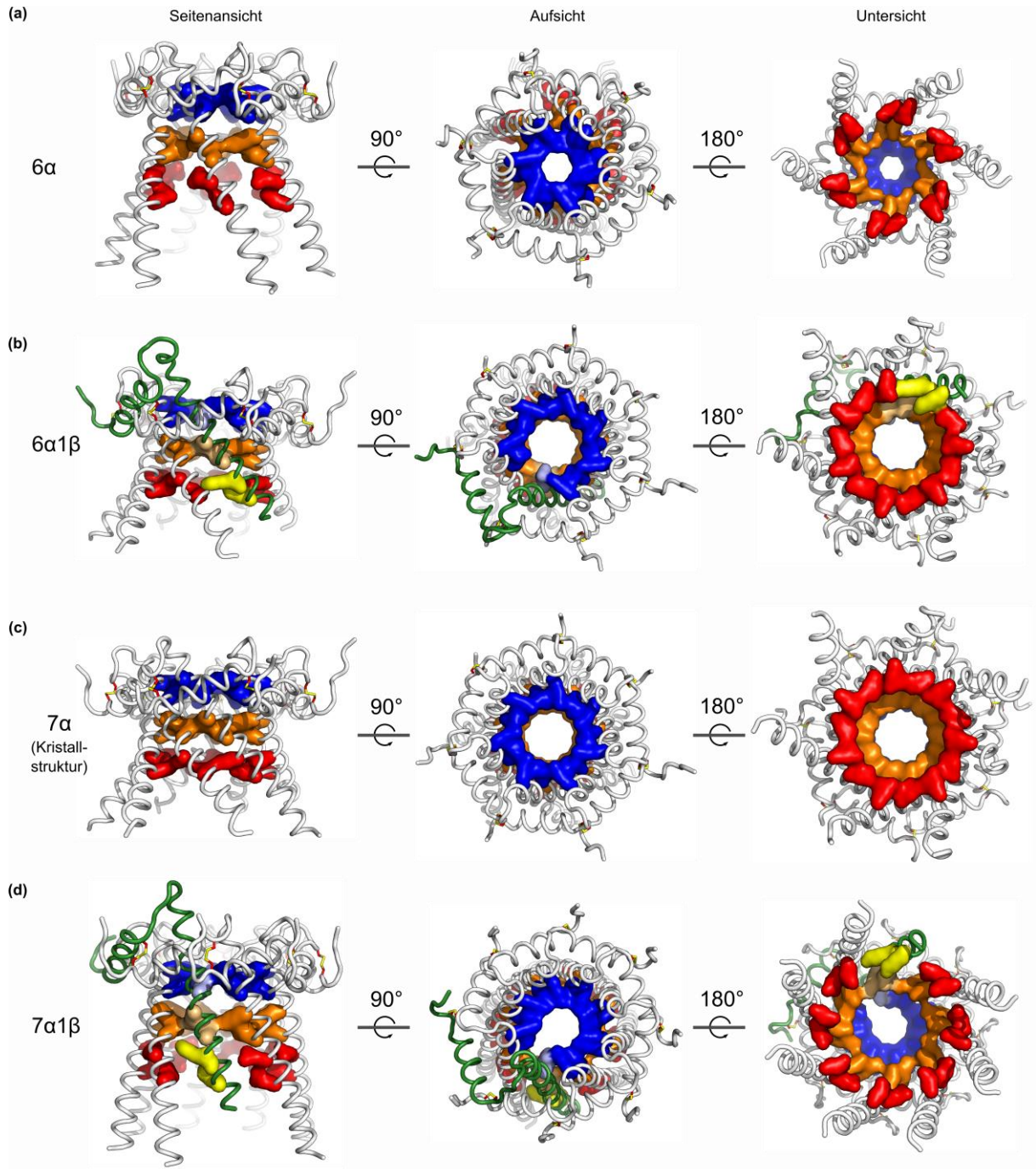
**Tabelle 16:** Zusammenfassung der Winkel, welche die Geometrie der Helices H1 und H2 zueinander ( $\alpha$  und  $\beta$ ) sowie die Neigung von H2 relativ zur Vertikalachse ( $\gamma$ ) beschreiben.

Isoform	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
$6\alpha$	$27,2 \pm 0,9$	$90,8 \pm 1,0$	$27,3 \pm 2,4$
$6\alpha 1\beta$	$21,2 \pm 0,7$	$87,6 \pm 5,1$	$37,6 \pm 0,9$
$7\alpha$	$20,3 \pm 0,6$	$86,1 \pm 1,6$	$37,1 \pm 1,1$
$7\alpha 1\beta$	$23,2 \pm 2,3$	$85,0 \pm 2,5$	$23,6 \pm 4,1$



**Abb. 27:** Positionen der Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (a) Monomer (b) Ein Monomer (blau) im Kontext der 7 $\alpha$ -Isoform. Verkleinerter Ausschnitt von Abb. 19 (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Eine Zusammenstellung aller Modelle sowie die Kristallstruktur der 7 $\alpha$ -Isoform sind in Abb. 28 abgebildet.



**Abb. 28:** Modelle aller bekannten natürlich vorkommenden Isoformen der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP. Ausgehend von den Koordinaten der 7 $\alpha$ -Isoform wurden die drei übrigen Modelle erstellt: (a) 6 $\alpha$ , (b) 6 $\alpha$ 1 $\beta$ , (c) 7 $\alpha$ , (d) 7 $\alpha$ 1 $\beta$  (Farbgebung der Helices und stabilisierenden Schichten siehe Abb. 20). Jede Isoform ist von links nach rechts in Seiten-, Drauf- und Untersicht dargestellt, siehe Drehrichtung der Pfeile. Die  $\beta$ -Kette (b) und (d) ist in grün hervorgehoben. Aminosäurereste der  $\beta$ -Kette, welche mit den stabilisierenden Schichten 1 - 3 interagieren sind in hellblau, sandfarben und gelb dargestellt. Die stabilisierenden Ringe 1 (blau) und 3 (rot) sind in beiden Heterooligomer-Modellen nur noch unterbrochen vorhanden. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Interessanterweise scheinen die Modelle der 6 $\alpha$ - und 7 $\alpha$ 1 $\beta$ -Isoformen in der Seitenansicht im Vergleich zur Kristallstruktur der 7 $\alpha$ -Variante entlang der vertikalen Achse gestreckt. Der

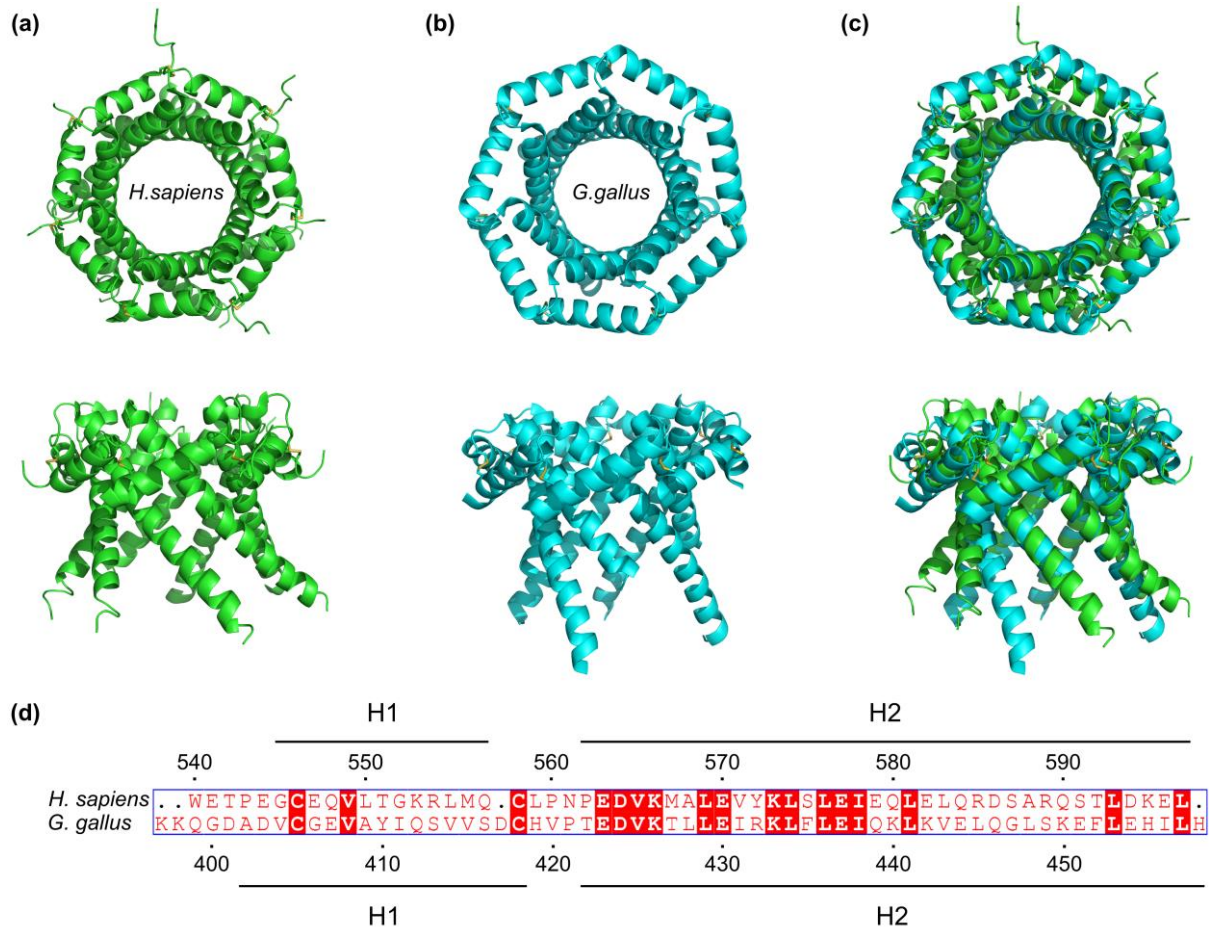


resultierende Deformationswinkel  $\alpha$  ist bei beiden Isoformen um ca. 3-7° erhöht, während der Deformationswinkel  $\beta$  mit  $\pm 1^\circ$  in dem 7 $\alpha$ 1 $\beta$ -Modell nahezu konstant bleibt ist er in dem 6 $\alpha$ -Modell mit ca. 4° leicht erhöht. Ein deutlicher Unterschied ist in dem Neigungswinkel  $\gamma$  zu beobachten, dieser ist in den Isoformen 6 $\alpha$  und 7 $\alpha$ 1 $\beta$  ca. 10° bzw. 14° kleiner.

#### 4.1.10 Diskussion

Zunächst waren keine optimalen Bedingungen für ein geordnetes Kristallwachstum bekannt, was zu ungenügenden Auflösungen zwischen 3 bis 4 Å führte. Wie sich später herausstellte konnte vor allem durch die relativ hohe molekulare Beweglichkeit (B-Faktoren) an den N- und C-Termini keine ausreichende Auflösung erreicht werden. Außerdem stand zum damaligen Zeitpunkt keine Struktur eines homologen Proteins zur Verfügung, um das Phasenproblem zu lösen. Sukzessiv konnten die Produktions- und Kristallisationsbedingungen verbessert werden und schließlich führte die SeMet-markierte M2A M6A Variante zur Auflösung der Struktur der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b-Bindeproteins. Die gefundene Kristallstruktur bestätigt die kurz zuvor generierten CD-spektroskopischen Daten über den  $\alpha$ -helikalen Charakter der Oligomerisierungsdomäne und deckt sich mit früheren Sekundärstrukturvorhersagen der monomeren Untereinheiten.<sup>61; 62</sup> Die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichte Struktur ist somit die erste Kristallstruktur der kompletten Oligomerisierungsdomäne der 7 $\alpha$ -Isoform des humanen C4b-Binderproteins.<sup>41</sup>

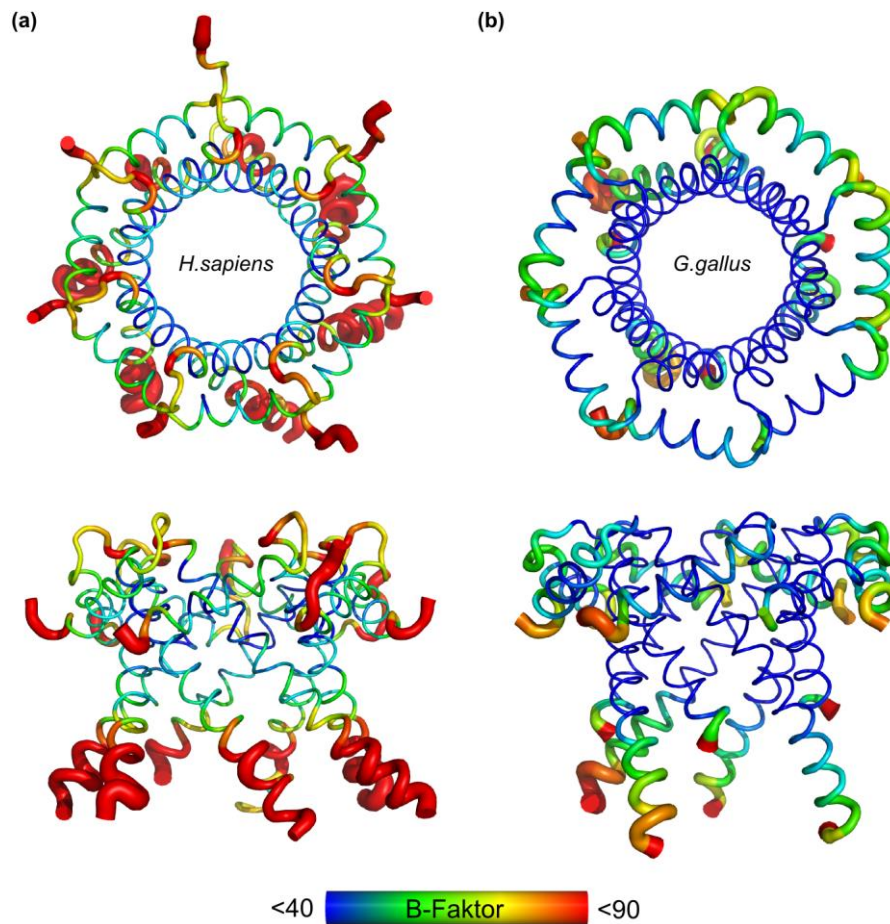
Wenige Monate vor der Veröffentlichung dieser Struktur wurde von Lea *et al.* in der Proteindatenbank die homologe Struktur der *Gallus gallus* C4BP 7 $\alpha$ -Oligomerisierungsdomäne veröffentlicht (PDB ID: 2YF2). Eine begleitende Publikation war jedoch bis zum Erscheinen der vorliegenden Dissertation nicht verfügbar. Bei einer ersten oberflächlichen Gegenüberstellung von hC4BP und ggC4BP sind sich die beiden Oligomerisierungsdomänen sehr ähnlich (Abb. 29). Beide zeigen die gleiche Topologie, aufgebaut aus 7 Untereinheiten, bestehend aus jeweils 2  $\alpha$ -Helices, die je nach Blickwinkel zu einem torus- bzw. champagnerkorkenförmigen Ganzen assemblieren.



**Abb. 29:** Vergleich zwischen den 7 $\alpha$ -Oligomerisierungsdomänen von hC4BP (grün) und ggC4BP (blau); Disulfidbrücken in Gelb (a) *H. sapiens* (4B0F) (b) *G. gallus* (2YF2) (c) Überlagerung der beiden Proteine (PyMOL: *fitting script*) (d) Alignment der Aminosäuresequenzen der beiden Oligomerisierungsdomänen; übereinstimmende Aminosäuren sind Rot hinterlegt; die Positionen der Helices H1 und H2 sind über bzw. unter der entsprechenden Sequenz angegeben; die Nummerierung erfolgte anhand der PDB IDs.

Bei einem genaueren Blick zeigen sich deutliche Unterschiede. Diese sind zum einen in einer sehr niedrigen Sequenzidentität von lediglich ~26% und zum anderen in der Verlängerung der ggH1 um eine weitere Aminosäure begründet. Diese zusätzliche Aminosäure vergrößert den Durchmesser des ggC4BP geringfügig und erhöht damit den Neigungswinkel  $\alpha$  zwischen H1 und H2 um ca. 7°. Die beiden anderen Winkel  $\beta$  und  $\gamma$  bleiben innerhalb der Standardabweichung unverändert. Des Weiteren ist der innere Durchmesser des letzten stabilisierenden Rings (K440 und E444) in ggC4BP ca. 7 Å kleiner im Vergleich zum hC4BP und nicht aus Wasserstoffbrückenbindungen sondern aus ionischen Wechselwirkungen aufgebaut. Prinzipiell sind in beiden Strukturen drei stabilisierende Ringe vorhanden, in diesem Proteinabschnitt liegen auch jeweils die Bereiche der geringsten molekularen Bewegung. Gemeinsam ist beiden Strukturen ebenfalls eine erhöhte molekulare Beweglichkeit in den N- und C-terminalen Bereichen (Abb. 30). Bei der *G. gallus* Struktur sind die B-Faktoren am C-Terminus so hoch, dass

in der PDB-Datei (2YF2) für drei der sieben C-Termini keine Strukturinformationen hinterlegt sind.



**Abb. 30:** Vergleich der molekularen Beweglichkeit entlang des Peptidrückgrates zwischen (a) C4BP *H. sapiens* und (b) C4BP *Gallus gallus*. Die Oligomerisierungsdomänen sind in der ersten Zeile in der Aufsicht und in der zweiten Zeile in der Seitenansicht dargestellt; blaue dünne Abschnitte symbolisieren Bereiche geringer Beweglichkeit, dicke rote Abschnitte Bereiche erhöhter molekularer Bewegung (siehe Legende).

In der Literatur wurde als Initiation für die Polymerisation der Untereinheiten die Zusammenlagerung C-terminaler amphipathischer Helices angeführt.<sup>42</sup> Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die erhöhte molekulare Beweglichkeit und die Ausbildung der zahlreichen Interaktionen entlang der benachbarten Helices H2 untereinander für die Oligomerisierung verantwortlich. Die Relevanz der C-terminalen Helix für die Assemblierung der Oligomerisierungsdomäne wird im folgenden Abschnitt (4.2) anhand der sukzessiven Verkürzung der C-terminalen Helix H2 weiter untersucht. Die Beweglichkeit am N-Terminus ist im Einklang mit der physiologischen Bedeutung dieses Proteinabschnitts als Verbindungsstück oder Scharnier zu den CCPs. Ein Großteil der Interaktionen zwischen dem C4BP und seiner Umwelt findet entlang der acht- bzw. dreigliedrigen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten statt (1.2).<sup>46</sup> Eine lösliche Produktion der kompletten C4BP  $\beta$ -Kette bestehend aus 3 CCPs und der C-terminalen



---

Oligomerisierungsdomäne war im gewählten Produktionssystem nicht möglich. Die Produktion der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne als Trx-Fusion resultierte dagegen in akzeptablen Ausbeuten (einstellig mg/L). Die Analyse des Fusionsproteins bzw. dessen Spaltung mit TEV-Protease in einer nichtreduzierenden SDS-PAGE zeigte eine teilweise Dimerisierung der  $\beta$ -Kette. Diese Dimerisierung scheint allerdings artifiziell zu sein, da unter physiologischen Bedingungen noch keine C4BP-Isoform gefunden wurde, die exklusiv aus  $\beta$ -Ketten aufgebaut ist.

Mit der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne der  $\alpha$ -Kette wurden zunächst relativ harsche Bedingungen identifiziert, die für eine vollständige Denaturierung erforderlich sind. Nach einer Dialyse und der damit verbundenen Abreicherung der denaturierenden Agentien wurde eine spontane Reassemblierung von diskreten Heptameren beobachtet. Diese Methode konnte auf das Trx-C4BP $\alpha$  Fusionsprotein übertragen werden und führte nach vollständiger Denaturierung und anschließender Dialyse ebenfalls zu einer erneuten Oligomerisierung. Die Erzeugung eines C4BP Heterooligomers, bestehend aus C4BP $\alpha$  und TrxC4BP $\beta$  war mit dieser Methode jedoch nicht nachweisbar. Über die *in vivo* Assemblierung der C4BP Isoformen ist wenig bekannt. Möglicherweise ist für die Assemblierung der heterooligomeren Isoformen die Anwesenheit von Chaperonen erforderlich. In einer Publikation aus dem Jahr 1997, in der die Oligomerisierungsdomäne der  $\alpha$ -Kette des humanen C4BP erstmals als Grundgerüst Verwendung findet, wurde bereits vorgeschlagen, über die Verwendung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten Heterooligomere mit einem kontrollierten Verhältnis der Untereinheiten herzustellen.<sup>63</sup> Die Erzeugung von mehrfach funktionalisierten Heterooligomeren auf Basis des C4BP wurde bis heute allerdings nur über eine Koexpression unterschiedlich funktionalisierter Oligomerisierungsdomänen der  $\alpha$ -Kette erreicht, wobei das Ergebnis eine statistische Verteilung darstellt.<sup>58; 66</sup> In zwei der vier beschriebenen physiologisch vorkommenden C4BP-Isoformen ist eine  $\beta$ -Kette enthalten, daher wurden in Zusammenarbeit mit Matteo T. Degiacomi aufbauend auf der 7 $\alpha$ -Kristallstruktur *in silico* Modelle der drei übrigen C4BP-Isoformen erstellt. Bei diesen Simulationen wurde davon ausgegangen, dass die  $\beta$ -Kette ähnlich den  $\alpha$ -Ketten ein Teil der ringförmigen Struktur ist. In dem vorgeschlagenen Modell ist die  $\beta$ -Kette im Vergleich zu den benachbarten  $\alpha$ -Ketten um 7 Aminosäuren entlang der vertikalen Achse nach oben verschoben. In dieser Position können zwar die Disulfidbrücken zwischen den Helices H1 ausgebildet werden, die stabilisierenden Ringe zwischen den Helices H2 werden allerdings nur unvollständig ausgebildet. Über die Relevanz der etablierten Bindungen der Heterooligomere für eine *in vivo* Funktionalität kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Auffällig ist jedoch bei allen Isoformen die relativ hohe Anzahl von intermolekularen Bindungen die zwischen den einzelnen Untereinheiten realisiert werden. Neben den Disulfidbrücken werden

die Oligomere zusätzlich von stabilisierenden Schichten durchspannt und zusammengehalten. Berücksichtigt man den physiologischen Kontext ergibt das durchaus Sinn, denn an den Oligomerisierungsdomänen inserieren die CCPs ( $\alpha$  und  $\beta$ ) über welche die Isoformen mit ihrer Umwelt interagieren. Die spinnenförmigen Isoformen zirkulieren praktisch permanent als Komplex mit anderen Proteinen im Plasma und/ oder liegen gebunden auf Zelloberflächen vor.<sup>46</sup> Das Vorhandensein der Disulfidbrücken auf der einen und die große Zahl intermolekularer Bindungen auf der anderen Seite spiegelt möglicherweise eine gewisse Redundanz wieder, da bspw. das Maus-C4BP über keine Disulfidbrücken in der Oligomerisierungsdomäne verfügt.<sup>186</sup> Für das Maus-C4BP sind außerdem nur Isoformen ohne  $\beta$ -Ketten bekannt, denn das Gen für die *Mus musculus*  $\beta$ -Kette hat sich im Laufe der Evolution zu einem Pseudogen mit zwei Stoppcodonen entwickelt.<sup>187</sup> Möglicherweise erfordert die Bindung an Protein S und die daraus resultierende Interaktion mit dem Koagulationssystem der C4BP-Isoformen mit  $\beta$ -Kette eine zusätzliche Verstärkung der Oligomerisierungsdomäne. Um die Struktur und Positionierung der  $\beta$ -Kette abschließend zu klären, sind weitere Experimente nötig. Möglicherweise stößt das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem hier an seine Grenzen. Am elegantesten wäre es, durch die Koexpression der beiden Untereinheiten in einem geeigneten Expressionssystem, ausreichende Mengen der Heterooligomere für eine Strukturanalyse zu gewinnen. Mit diesem Ansatz könnte gleichzeitig eine Plattform zur Herstellung homogener Heterooligomere etabliert werden. Längerfristig könnte das in dieser Arbeit entwickelte und in Abschnitt 4.3 beschriebene Expressionssystem in *Yarrowia lipolytica* hierfür zum Einsatz kommen.

In einer Publikation von Kask *et al.* 2004 wurde bereits auf die außergewöhnliche Stabilität von plasmagereinigtem humanen C4BP hingewiesen.<sup>188</sup> Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte kompakte Architektur der Oligomerisierungsdomäne in Kombination mit der Vielzahl verschiedener intermolekularer Bindungen bietet hierfür eine plausible Erklärung. Im folgenden Abschnitt werden anhand spezifischer C4BP-Varianten Faltung und Stabilität des Heptamers untersucht. Des Weiteren wird untersucht, in wie weit die N- und C-Termini relevant für die Oligomerisierung sind bzw. einen Beitrag zur Gesamtstabilität der Oligomerisierungsdomäne leisten.

## 4.2 Untersuchung von Stabilität und Funktionalisierung

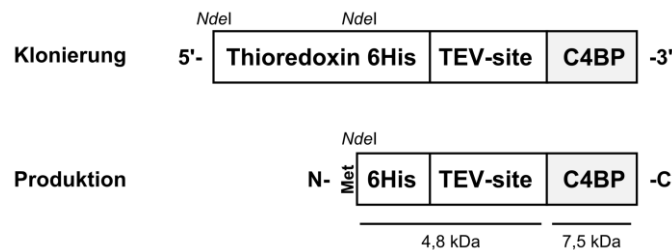
Neben der Aufklärung der Kristallstruktur der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne der 7 $\alpha$ -Isoform des humanen C4BP war deren biochemische und biophysikalische Charakterisierung ein Schwerpunkt dieser Arbeit. Hierzu wurden diverse Varianten der Oligomerisierungsdomäne kloniert und produziert. Um den Reinigungsprozess ggf. abzukürzen wurde untersucht, ob eine lösliche Produktion ohne N-terminale Thioredoxin-Fusion möglich ist (4.2.1). Zur Identifikation der für die Assemblierung essentiellen Bereiche wurde die Oligomerisierungsdomäne zunächst sukzessive am C-Terminus verkürzt (4.2.2). Die hierbei kürzeste identifizierte Variante welche noch in der Lage war Oligomere auszubilden, wurde daraufhin zusätzlich am N-Terminus verkürzt. (4.2.3). Des Weiteren wurde versucht, mittels CD-Spektroskopie über thermische Denaturierung die Schmelztemperatur der Oligomerisierungsdomäne zu bestimmen. Eine Entfaltung des Proteins durch Zugabe denaturierender Agentien (Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid) bzw. Dithiothreitol als Reduktionsmittel in Kombination mit thermischer Denaturierung war nicht möglich, da Verunreinigungen in den zugesetzten Komponenten die CD-Signale im nahen UV-Bereich überdeckten (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde für eine weitere Charakterisierung der Stabilität Thermo-Fluor-Messungen durchgeführt.<sup>189</sup> Mit dieser Methode wurden das Wildtypprotein sowie definierte Mutanten untersucht (4.2.4 und 4.2.5). Dann werden drei Mutanten vorgestellt, mit denen versucht wurde, die Anzahl der im Oligomer assemblierten Monomere durch Verschiebung der intermolekularen Disulfidbrücken zu variieren (4.2.6). Abschließend wird in diesem Kapitel auf zwei Möglichkeiten der bioorthogonalen Modifikation eingegangen (4.2.7.1 und 4.2.7.2).

### 4.2.1 C4BP Produktion ohne Trx

Im vorangegangenen Abschnitt wurde das etablierte Protokoll zur Produktion und Reinigung der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne als Trx-Fusionsprotein im *E. coli*-Stamm Origami (DE3) vorgestellt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden diverse Varianten und Version des hC4BP kloniert und produziert. Überraschenderweise lieferte die Produktion der SeMet-markierten Varianten in dem *E. coli*-Stamm B834 (DE3) trotz Expression in reduzierendem Cytoplasma Protein mit korrekt verknüpften Disulfidbrücken. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die hC4BP Oligomerisierungsdomäne auch ohne Trx-Fusion (C4BP  $\Delta$ Trx) löslich und in korrekter Faltung produziert werden kann. Im positiven Fall würden sich Möglichkeiten zu einer Beschleunigung des Reinigungsschrittes im Produktionsprozess ergeben.

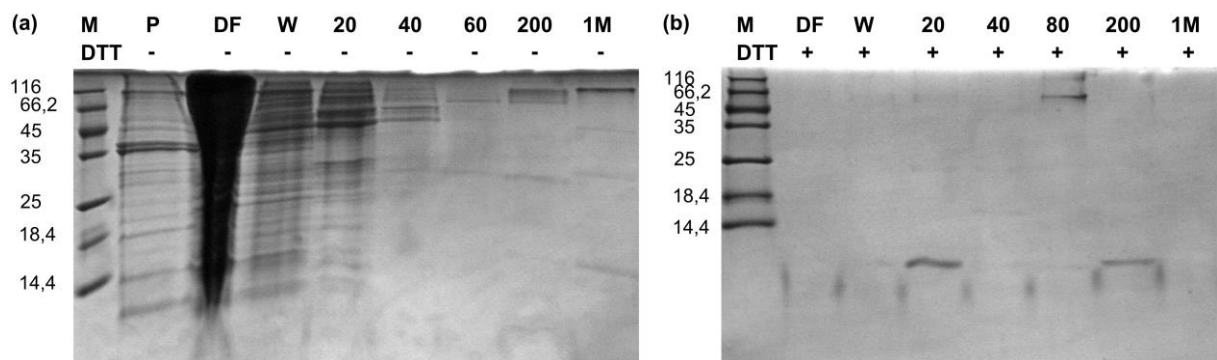
Im Plasmid pET32aTrx C4BP wird das 345 bp große Trx-Gen auf beiden Seiten von *Nde*I-Erkennungsstellen (CATATG) flankiert (Abb. 31). Durch Spaltung mit diesem Restriktionsenzym (3.4.3) und anschließende Religation mit T4-DNA-Ligase (3.4.6) konnte das Trx-Gen entfernt

werden. Das Basentriplett ATG der religierten *NdeI*-Erkennungsstelle stellt hierbei das neue Startcodon. Auf diese Weise verbleibt am N-Terminus des hC4BP anstatt des Chaperons Thioredoxin lediglich ein 4,8 kDa großes Fragment (42 AS), das durch TEV-Protease-Spaltung abgetrennt werden kann.



**Abb. 31:** Schematische Übersicht zur Klonierung und Produktion des C4BP  $\Delta$ Trx Konstrukts. Restriktion des C4BP-Wildtyp Plasmid mit *NdeI* und Religation liefert die C4BP  $\Delta$ Trx Variante. Spaltung des heterologen Proteins mittels TEV-Protease führt zu einem N-terminalen Fragment das neben 6His-Epitop und TEV-site diverse hier nicht relevante Erkennungsstellen enthält (4,8 kDa) und C4BP (7,5 kDa).

Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert (3.4.8) und durch Sequenzierung verifiziert. Die Proteinproduktion erfolgte in Origami (DE3) analog zu den in Abschnitt (4.1.4.1) beschriebene Konditionen. In Abb. 32 ist die Reinigung einer 1 L Produktion der C4BP  $\Delta$ Trx Variante dokumentiert.



**Abb. 32:** SDS-PAGE Analyse einer 1 L Produktion C4BP  $\Delta$ Trx. **(a)** SDS-PAGE beladen mit den folgenden IMAC-Fractionen: P: Pellet, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, es folgen die Imidazolkonzentrationen 20 – 200 in mM und 1 M. Es wurde ein Probenauftragspuffer ohne DTT verwendet. **(b)** SDS-PAGE mit den IMAC-Fractionen nach der Spaltung mit TEV-Protease (nicht gezeigt). Beschriftung der Spuren siehe (a). Der Probenauftrag erfolgte mit DTT-haltigem Probenauftragspuffer.

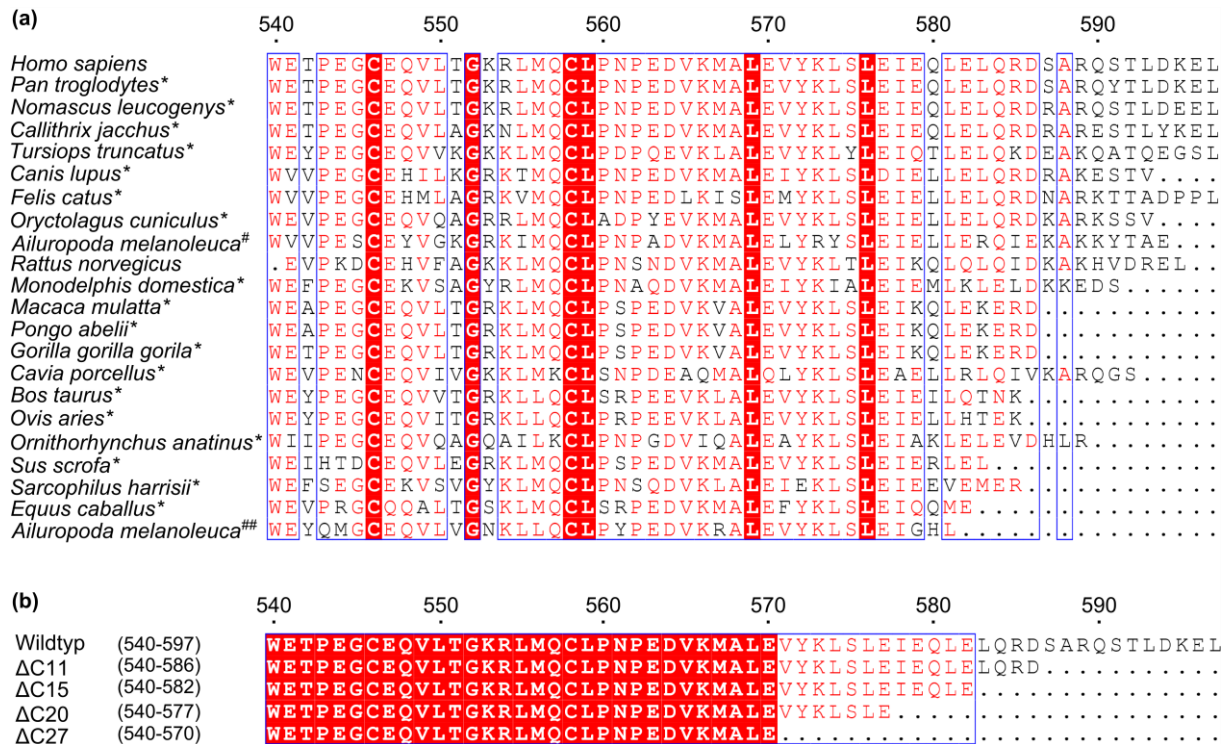
Die Produktion von C4BP ohne das Chaperon Trx war möglich, allerdings befand sich die Ausbeute pro Liter Bakterienkultur im niedrigen einstelligen Milligrammbereich. Als Trx-Fusionsprotein wurden Ausbeuten im zweistelligen Milligrammbereich erzielt. In Abb. 32 (a) ist

---

das Heptamer mit einem MW von 86,45 kDa in den Fraktionen 200 mM und 1 M zwischen den Markerbanden 116 und 66,2 zu erkennen. Nach der TEV-Protease-Spaltung (3.2.12) eluierte das Heptamer in der darauffolgenden IMAC bei 20 mM Imidazol. Prinzipiell scheint die Produktion der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne ohne das Chaperon Thioredoxin möglich, ist aber aufgrund der verringerten Ausbeute nicht zielführend. Der positive Effekt einer Trx-Fusion auf die Ausbeute an Protein kann hierbei drei unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen erhöht eine Trx-Fusion die Löslichkeit des rekombinant angefügten Fusionspartners.<sup>146</sup> Zweitens unterstützt es die korrekte Verknüpfung von Disulfidbrücken und drittens wird allgemein davon ausgegangen, dass Trx als Chaperon bei der Proteinfaltung behilflich ist.<sup>146; 190</sup>

#### 4.2.2 C-terminale Verkürzung

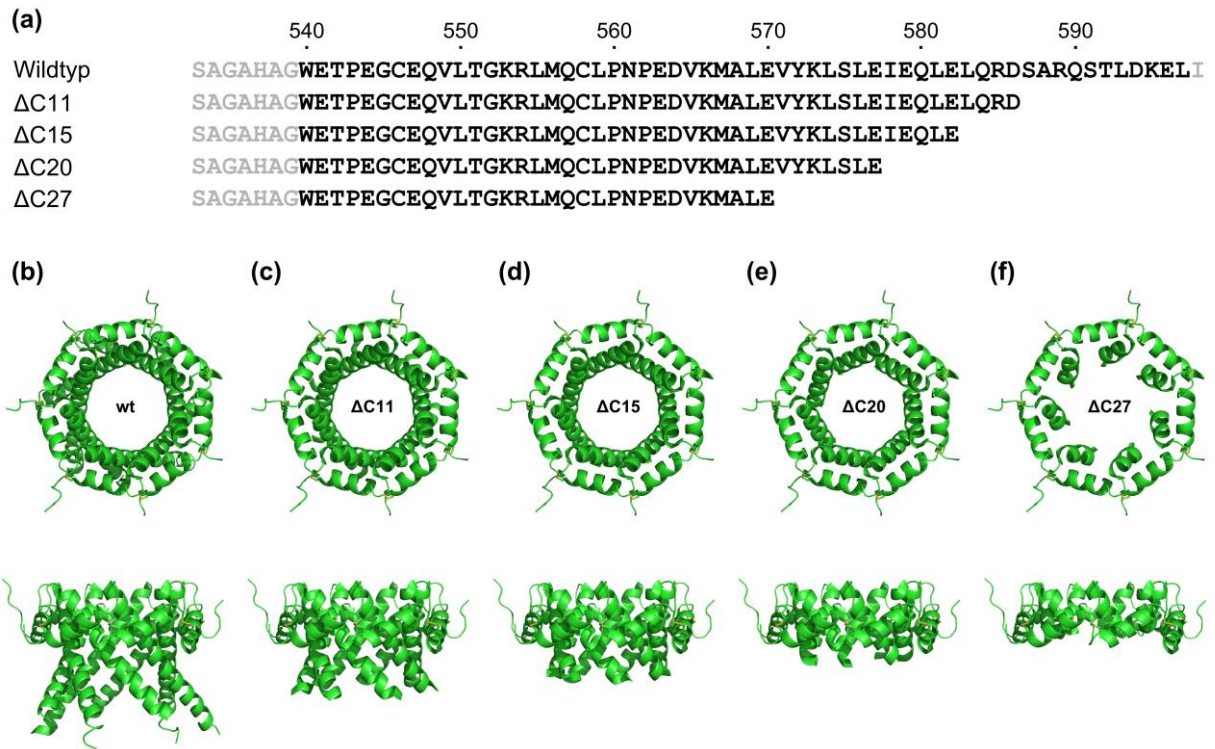
Frühere Veröffentlichungen haben bereits Hinweise darauf geliefert, dass die Assemblierung der C4BP-Monomere zu einem übergeordneten Komplex durch C-terminale Helices initiiert wird.<sup>42</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte eine Oligomerisierung der heterolog in *E. coli* produzierten 58 C-terminalen Aminosäuren realisiert und die Präsenz der vorhergesagten Helices mit der aufgelösten Kristallstruktur bestätigt werden. Die physiologische Aufgabe dieser Domäne ist es, als Grundgerüst für die Befestigung der CCPs zu dienen und damit eine stabile Plattform für deren Interaktion mit diversen Proteinen und Oberflächen bereitzustellen. Für eine biotechnologische Nutzung der Oligomerisierungsdomäne sollte der für die Assemblierung essentielle Bereich identifiziert oder zumindest eingegrenzt werden. Zum Zeitpunkt dieser Experimente standen jedoch noch keine Informationen über die Struktur der Oligomerisierungsdomäne zur Verfügung. Um trotz fehlender Strukturinformationen Anhaltspunkte für eine Verkürzung zu erhalten, wurde ein Alignment diverser C4BP-Sequenzen durchgeführt. Die Sequenzen hierfür lieferte eine Durchmusterung der NCBI Datenbank mit den 58 C-terminalen Aminosäuren des hC4BP als Suchanfrage. In Abb. 33 ist das Alignment von 21 Sequenzen dieser Suchanfrage mit der hC4BP-Sequenz abgebildet. Auf Basis dieses Sequenzvergleiches wurden vier sukzessive am C-Terminus verkürzte C4BP-Varianten definiert. Die Klonierung, Produktion und Analyse der Mutanten, wurde im Rahmen eines studentischen Praktikums (Carmen Feinweber) durchgeführt.



**Abb. 33:** (a) Alignment der hC4BP Oligomerisierungsdomäne mit 21 Treffern einer NCBI-Datenbankdurchmusterung. Aminosäuren welche identisch zum hC4BP sind wurden in roten Buchstaben dargestellt; rot umrandete Aminosäuren sind in allen verglichenen Sequenzen konserviert; ein blauer Rahmen zeigt eine Übereinstimmung > 50%. Die Nummerierung erfolgte anhand der *H. sapiens* Sequenz (gilt nicht für die übrigen Sequenzen). *Homo sapiens*: Mensch, *Pan troglodytes*: Gemeiner Schimpanse, *Nomascus leucogenys*: Nördlicher Weißwangen-Schopfgibbon, *Callithrix jacchus*: Weißbüschelaffe, *Tursiops truncatus*: Großer Tümmler, *Canis lupus*: Haushund, *Felis catus*: Hauskatze, *Oryctolagus cuniculus*: Wildkaninchen, *Ailuropoda melanoleuca*: Großer Panda, *Rattus norvegicus*: Wanderratte, *Monodelphis domestica*: Spitzmausbeutelratte, *Macaca mulatta*: Rhesusaffe, *Pongo abelii*: Sumatra-Orang-Utan, *Gorilla gorilla gorilla*: Westlicher Flachlandgorilla, *Cavia porcellus*: Hausmeerschweinchen, *Bos taurus*: Hausrind, *Ovis aries*: Hausschaf, *Ornithorhynchus anatinus*: Schnabeltier, *Sus scrofa*: Wildschwein, *Sarcophilus harrisii*: Beutelteufel, *Equus caballus*: Hauspferd. \*: PREDICTED: C4b-binding protein alpha chain-like, #: hypothetical protein PANDA\_018754, ##: hypothetical protein PANDA\_018752 (b) Übersicht zu den C-terminal verkürzte Varianten: Wildtyp-Sequenz, ΔC11, ΔC15, ΔC20 und ΔC27.

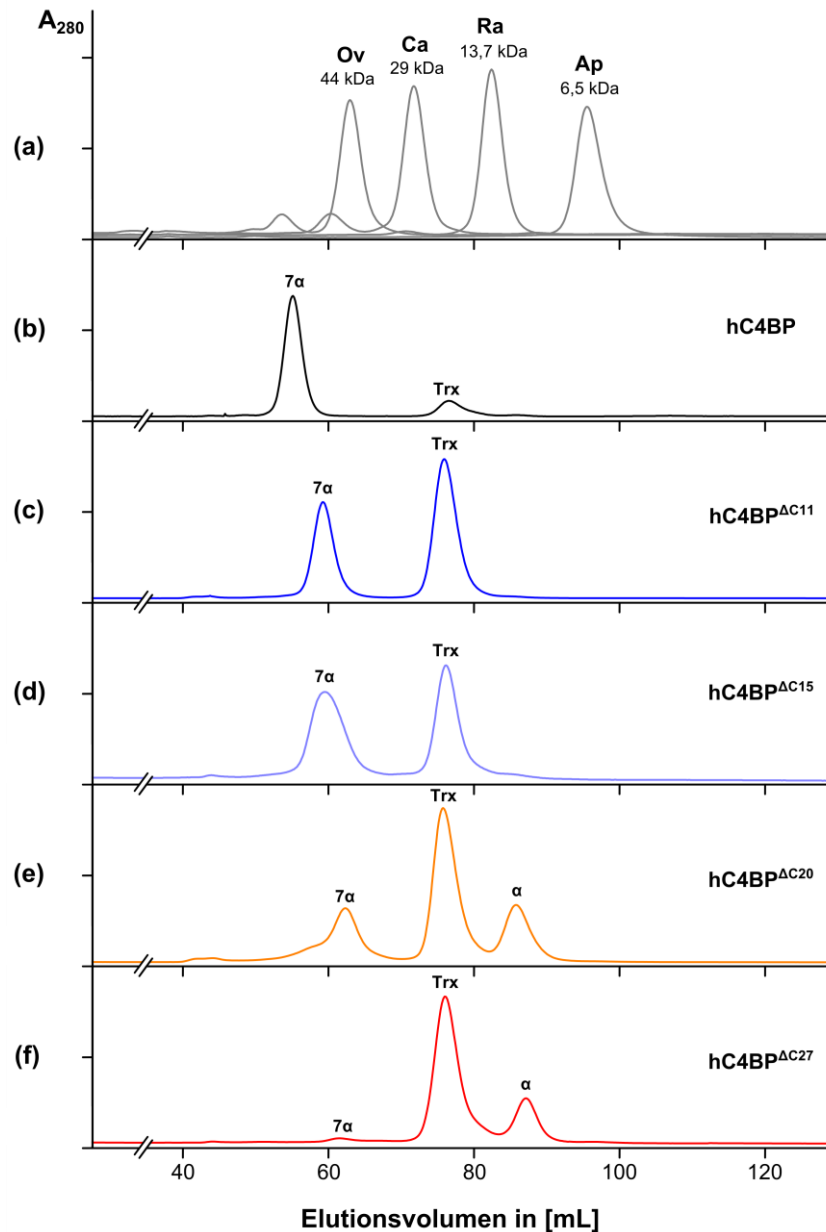
Die Klonierung erfolgte mittels SOE-PCR (3.4.7) unter Verwendung der in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide. Die PCR-Produkte und das Expressionsplasmid pET-32a-Trx-FimF-tGFP wurden mit den Restriktionsendonukleasen *MscI* und *XhoI* gespalten (3.4.3) durch Extraktion aus einem Agarosegel (3.4.5) bzw. Fällung (3.4.2) gereinigt und im Anschluss ligiert (3.4.6). Elektrokompente *E. coli* Top10 Zellen wurden mit den Ligationsprodukten transformiert (3.1.5), auf Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mittels Kolonie-PCR wurden positive Einzelklone identifiziert (3.4.8) und abschließend durch Sequenzierung verifiziert. Eine Übersicht der Primär- und Tertiärstrukturen der vier Mutanten im Kontext mit dem Wildtypprotein wird in Abb. 34 gegeben. Die Produktion und Reinigung der verkürzten Varianten erfolgte prinzipiell nach dem in Abschnitt 4.1.1 erläuterten Protokoll. Abweichend von diesem wurde nach der proteolytischen Spaltung der Trx-Fusionsproteine mit TEV-Protease das Thioredoxin nicht mittels IMAC aus dem Spaltansatz entfernt.





**Abb. 34:** Übersicht zu den C-terminal verkürzten Mutanten der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des hC4BP. (a) Aminosäuresequenzen der Varianten nach Abspaltung des N-terminalen Trx mittels TEV-Protease: Wildtyp, ΔC11, ΔC15, ΔC20 und ΔC27. Von der Wildtypsequenz abweichende Aminosäuren sind grau markiert. (b) hC4BP 7α-Isoform (4B0F), (c-f) Strukturmodelle der C-terminal verkürzte Varianten, jeweils in Auf- und Seitensicht, Disulfidbrücken sind in Gelb hervorgehoben.

Die TEV-Protease-Spaltungen der verkürzten Trx-Fusionsproteine wurden durch Ultrafiltration jeweils auf ein Volumen von 1 mL eingengt (3.2.11) und mittels SEC analysiert (3.3.3). Das abgespaltene Trx wurde bewusst in den Proben belassen, um als interner Standard zu fungieren. Die Elutionsprofile der Proteolyseprodukte sind in Abb. 35 zum besseren Vergleich untereinander angeordnet.



**Abb. 35:** Dargestellt sind die Elutionsprofile der sukzessive verkürzten C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP. Es wurde jeweils das Gemisch der Proteolyseprodukte der Trx-Fusionsproteine nach Zugabe von TEV-Protease mittels SEC (Superdex 75 pg 16/60) aufgetrennt. **(a)** Eichproteine: Ovalbumin: 44 kDa (Ov), Carboanhydrase: 29 kDa (Ca), Ribonuklease A: 13,7 kDa (Ra), und Aprotinin: 6,5 kDa (Ap). **(b-f)** Chromatogramme der unterschiedlichen Varianten; Peaks auf der linken Seite entsprechen Varianten, welchen die Fähigkeit zur Oligomerisierung erhalten geblieben ist ( $7\alpha$ ). Der Peak bei 78 mL steht für den abgespaltene Thioredoxin-Fusionspartner (Trx 17,1 kDa). Monomere werden ab einer C-terminalen Verkürzung von mehr als 15 Aminosäuren beobachtet (e und f). (b) hC4BP: 52,5 kDa, (c) hC4BP $\Delta C11$ : 43,1 kDa, (d) hC4BP $\Delta C15$ : 39,5 kDa, (e) hC4BP $\Delta C20$ : 35,4 kDa, (f) hC4BP $\Delta C27$ : 29,4 kDa. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

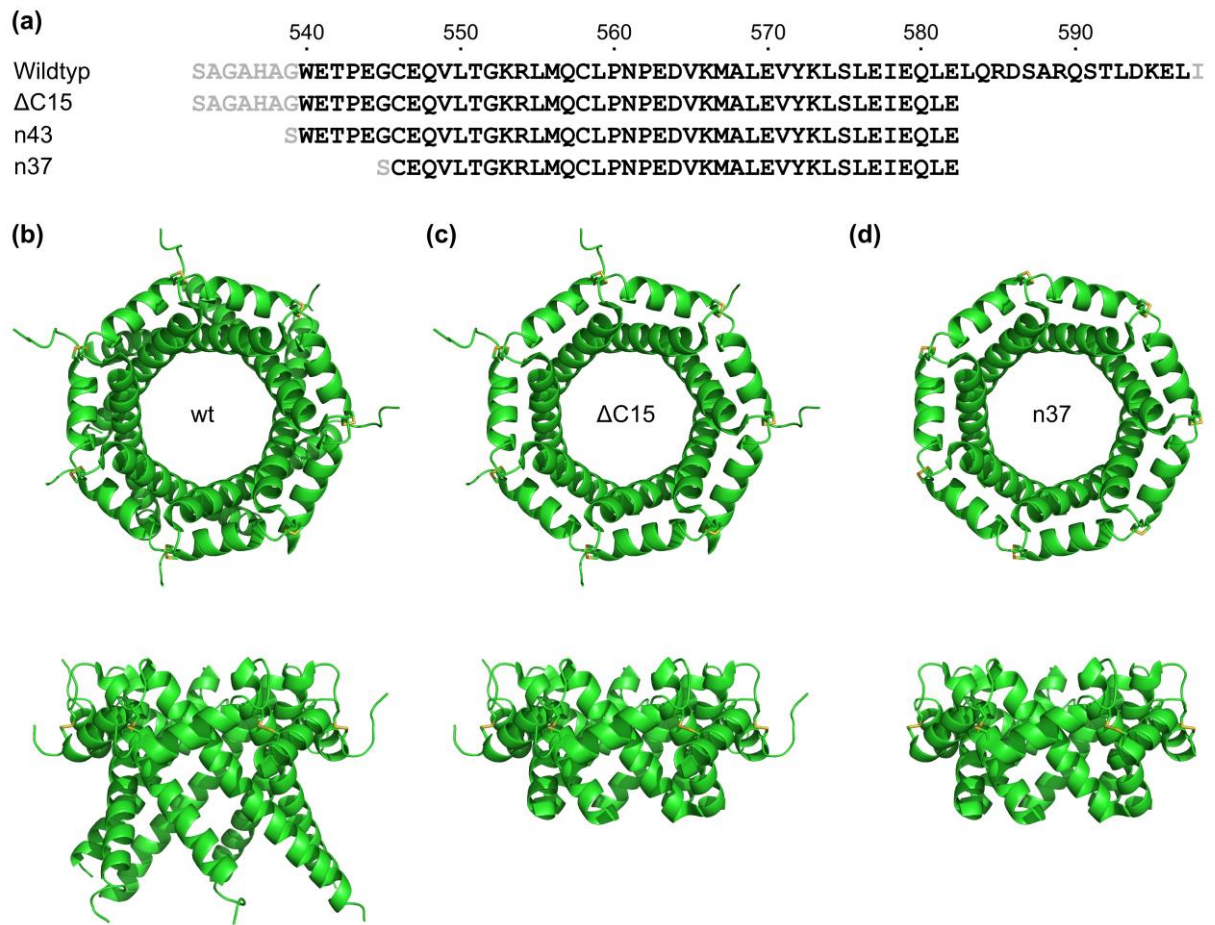
Durch dieses Experiment konnte ein Abschnitt zwischen 37-42 Resten (hC4BP $\Delta C20$  bzw. hC4BP $\Delta C15$ ) identifiziert werden, der für eine erfolgreiche Oligomerisierung benötigt wird. Eine weitere Verkürzung der C-terminalen Helix H2 (hC4BP $\Delta C20$  und hC4BP $\Delta C27$ ) zeigt erst eine starke Beeinträchtigung und später den Verlust der Oligomerisierungsfähigkeit, siehe Abb. 35 (e) und



(f). Dies zeigt, dass der im inneren gelegene Ring aus Wasserstoffbrückenbindungen (Gln580 and Gln584) die Assemblierung des C4BP unterstützt, aber für diese nicht zwingend erforderlich ist. Möglicherweise kann der Verlust dieser Region durch die weiter oben auf der Außenseite realisierten Wasserstoffbrückenbindungen (Tyr572 and Glu582) kompensiert werden. Eine weitere Verkürzung als hC4BP<sup>ΔC15</sup> zerstört diese Klammer und die Fähigkeit der Mutante zur Oligomerisierung.

#### 4.2.3 N-terminale Verkürzung

Die erfolgreiche heterologe Produktion funktionalisierter Varianten der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP und dessen Derivate ist für diverse Expressionssysteme beschrieben. Um Limitierungen dieser Systeme zu umgehen bzw. neue Anwendungsmöglichkeiten zu erschließen, wäre es wünschenswert die C4BP-Oligomerisierungsdomäne für eine vollsynthetische Herstellung zugänglich zu machen. Für eine kosteneffiziente Synthese mittels SPPS (*solid phase peptide synthesis*) mit guten Ausbeuten, sollte das zu synthetisierende Peptid so kurz wie möglich sein (max. Länge: 40-50 Aminosäuren). Des Weiteren würde eine kürzere *scaffold*-Sequenz mehr Platz für eine Funktionalisierung durch eine biologisch aktive Peptidsequenz bieten. Um Anhaltspunkte für die chemische Synthese einer C4BP-Minimalsequenz zu erhalten wurde zunächst die Oligomerisierungsfähigkeit verkürzter C4BP-Varianten im etablierten *E. coli* Expressionssystem untersucht. Erkenntnisse aus diesem Experiment sollten in die Planung einer vollsynthetischen Variante einfließen. Ausgangspunkt für die N-terminale Verkürzung war die bereits C-terminal verkürzte C4BP<sup>ΔC15</sup> Variante. Für dieses Experiment wurden die beiden Konstrukte n43 und n37 hergestellt (n: N-terminal verkürzte C4BP<sup>ΔC15</sup> Variante, 43 bzw. 37 Anzahl der Aminosäuren nach Spaltung mit TEV-Protease). In der ersten Variante sollte der aus sechs Aminosäuren bestehende Abstandhalter (MGAHMG) zwischen TEV-Schnittstelle und C4BP entfernt werden, in der zweiten wurden zusätzlich die ersten sechs Aminosäuren der C4BP-Sequenz (WETPEG) entfernt. Ein Überblick zu den Varianten ist in Abb. 36 gegeben.



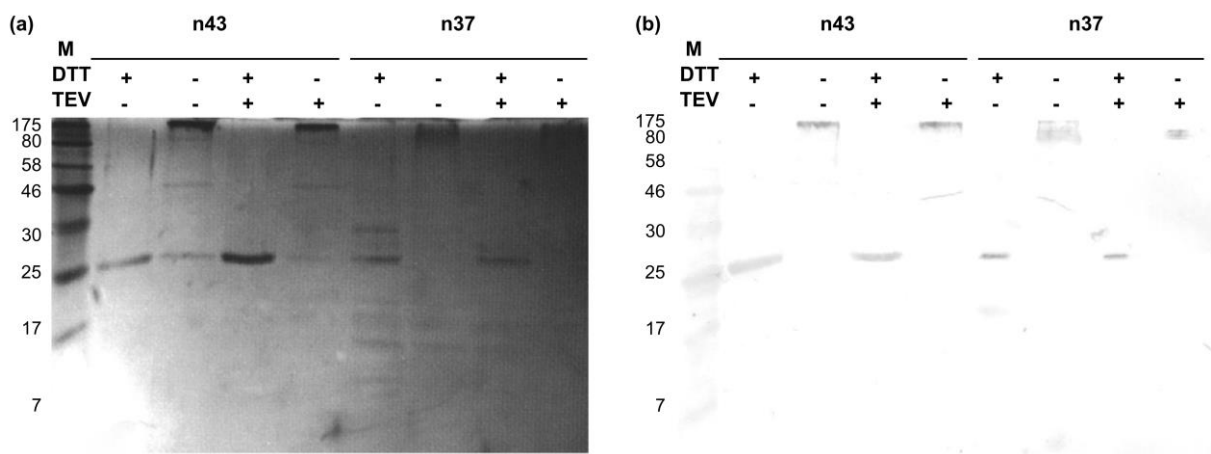
**Abb. 36:** Übersicht zu den N- und C-terminal verkürzten Varianten der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP. (a) Sequenzvergleich zwischen dem Wildtyp, hC4BP $\Delta C15$  sowie den beiden N-terminal verkürzten Varianten n43 und n37. Von der nativen Sequenz abweichende Aminosäuren sind in Grau dargestellt. (b-d) Cartoon-Darstellung des Wildtyps, hC4BP $\Delta C15$  und n37, jeweils in Auf- und Seitensicht. Disulfidbrücken sind in Gelb hervorgehoben.

Mit den entsprechenden Oligonukleotiden (2.3) und Standard PCR-Reaktionen (3.4.7) wurden die Sequenz verkürzt und die Restriktionsschnittstellen *MscI* und *XhoI* angefügt. Die PCR-Produkte sowie das Plasmid pET32a-Trx-FimF-tGFP wurden mit den Restriktionsenzymen *MscI* und *XhoI* gespalten (3.4.3), aus einem Agarosegel gereinigt (3.4.5) und im Anschluss ligiert (3.4.6). Elektrokompente *E. coli* Top 10 Zellen wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert (3.1.5) und auf Selektivplatten ausgestrichen. Positive Einzelklone wurden durch Kolonie-PCR identifiziert (3.4.8) und mittels Sequenzierung verifiziert. Die Klonierung, Proteinproduktion, Reinigung und Analyse wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Carmen Feinweber durchgeführt.<sup>172</sup> Die Produktion und Reinigung der beiden Proteine orientierte sich hierbei an dem in Abschnitt 4.1.1 vorgestellten Protokoll. Die TEV-Protease-Spaltung der gereinigten Fusionsproteine n43 und n37 wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 37), die zu erwartenden Fragmentgrößen sind in Tabelle 17 aufgeführt. Bei

diesem Experiment war das Hauptaugenmerk auf die Oligomerisierungsfähigkeit der Mutanten gerichtet, die Zugänglichkeit der TEV-*site* spielte eine untergeordnete Rolle.

**Tabelle 17:** Molekulargewichte (in kDa) der Mono- und Heptamere vor und nach Spaltung mit TEV-Protease der Varianten wt, n43 und n37. %wt: relatives Molekulargewicht im Vergleich zum Wildtyp-Protein.

	Trx-Monomer	Trx-Heptamer	Monomer	Heptamer	%wt
<b>wt</b>	24,62	172,34	7,52	52,64	100%
<b>n43</b>	22,18	155,26	5,08	35,56	67,54%
<b>n37</b>	21,49	150,43	4,38	30,66	58,23%



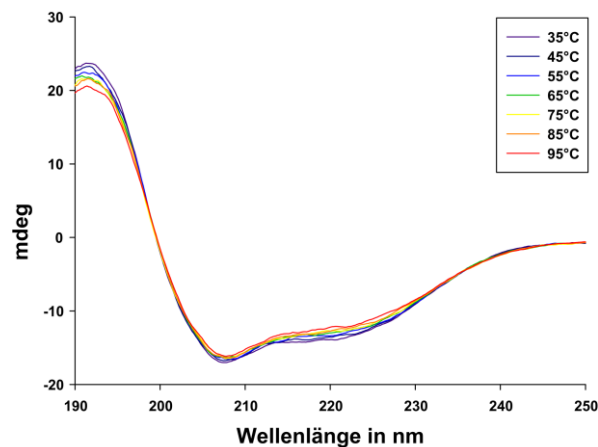
**Abb. 37:** Analyse der N-terminal verkürzten C4BP-Varianten n43 und n37. **(a)** SDS-PAGE und **(b)** Western Blot. Die Beladung von Gel und Blot ist identisch, es wurden die 200 mM Imidazol-Fractionen der vorangegangenen IMAC-Reinigung verwendet. Die Proben wurden mit (+) und ohne (-) DTT sowie vor (-) und nach (+) Inkubation mit TEV-Protease aufgetragen. (Modifiziert nach Diplomarbeit Feinweber<sup>172</sup>)

In beiden Mutanten bleibt die Fähigkeit zur Oligomerisierung erhalten. Eine Abspaltung des Thioredoxin-Fusionspartners mittels TEV-Protease wurde nicht beobachtet. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage offen, ob dies an der Unzugänglichkeit der Erkennungssequenz aufgrund der Verkürzung oder der Qualität der verwendeten TEV-Charge liegt. Die Ergebnisse belegen allerdings definitiv, dass weder der artifizielle *linker* noch die ersten sechs Aminosäuren des N-Terminus für eine oligomere Expression in *E. coli* erforderlich sind.

#### 4.2.4 Untersuchung der Thermostabilität

Neben der Analyse der Sekundärstrukturkomposition von Proteinen, erlaubt die CD-Spektroskopie auch die Dokumentation von Konformationsänderungen die beispielsweise über die Zugabe chaotroper Agentien oder Temperaturveränderungen induziert werden. Die ersten CD-spektroskopischen Messungen der Oligomerisierungsdomäne wurden bei RT durchgeführt

und zeigten, dass  $\alpha$ -Helices das dominierende Sekundärstrukturelement der Oligomerisierungsdomäne sind (Abschnitt 4.1.2, Abb. 12). Für die Bestimmung einer Schmelztemperatur wurde ein Temperaturgradient von 35 °C bis 95 °C gewählt. Die Temperatur wurde in Intervallen von 5 °C erhöht, aus Übersichtsgründen sind in Abb. 38 jedoch nur sieben Kurven abgebildet. Es wurde ein Bereich von 190 nm bis 250 nm mit einer Geschwindigkeit von 60 nm/min gescannt. Um Messungenauigkeiten zu minimieren wurde jede Temperaturstufe 10-fach gemessen.



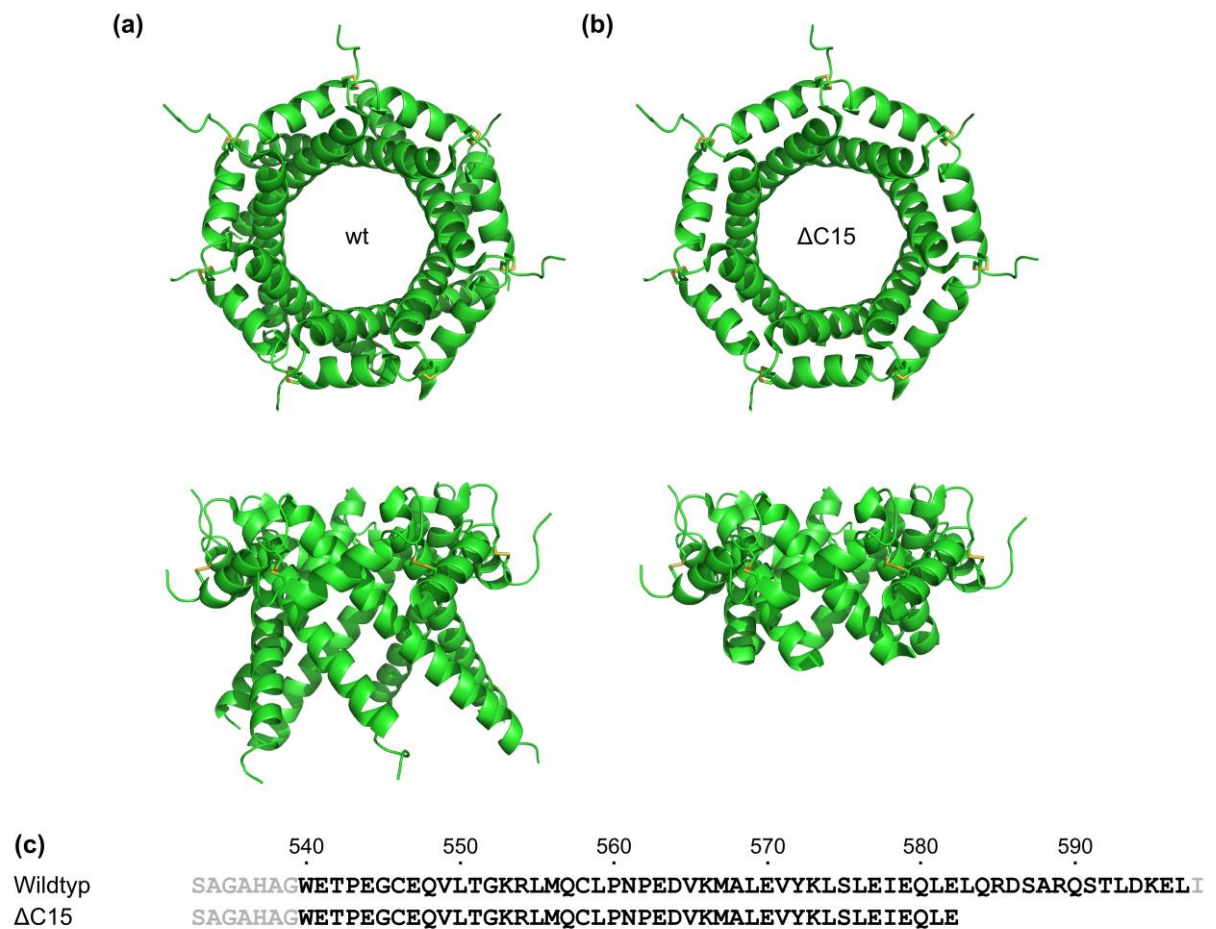
**Abb. 38:** CD-spektroskopische Untersuchung der Thermostabilität der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP. Gezeigt ist die Überlagerung der Einzelmessungen von 35 °C bis 95 °C. Die steigende Temperatur wird durch die Farbgebung von blau (kalt) nach rot (heiß) dargestellt. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Die CD-Messungen zeigen die außergewöhnliche Thermostabilität der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP. In CD-spektroskopischen Untersuchungen von rekombinant hergestelltem hC4BP über einen Tempergradienten von 35 °C bis 95 °C konnten keine signifikanten Änderungen der Sekundärstruktur detektiert werden. Um greifbare Daten über die Stabilität des hC4BP Oligomerisierungsdomäne zu generieren, wurden daher Thermofluor-Messungen durchgeführt.

#### 4.2.5 Thermofluor Messungen

Die Thermofluor-Methode liefert zwar keine Informationen über die Sekundärstrukturkomposition wohl aber über Grad der Faltung bzw. Entfaltung unter definierten Bedingungen. Im Zuge einer thermisch oder chemisch induzierten Denaturierung werden hydrophobe Bereiche des Proteins dem Lösungsmittel zugänglich und können den Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Orange aktivieren. Durch Verfolgung der Fluoreszenzänderungen kann die Entfaltung beobachtet und ein Schmelzpunkt berechnet werden (3.2.16). Darüber hinaus erlaubt diese Methode die Verwendung von reduzierenden, denaturierenden und elektrostatisch destabilisierenden Agentien. Zunächst wurden der Wildtyp (hC4BP) und die C-

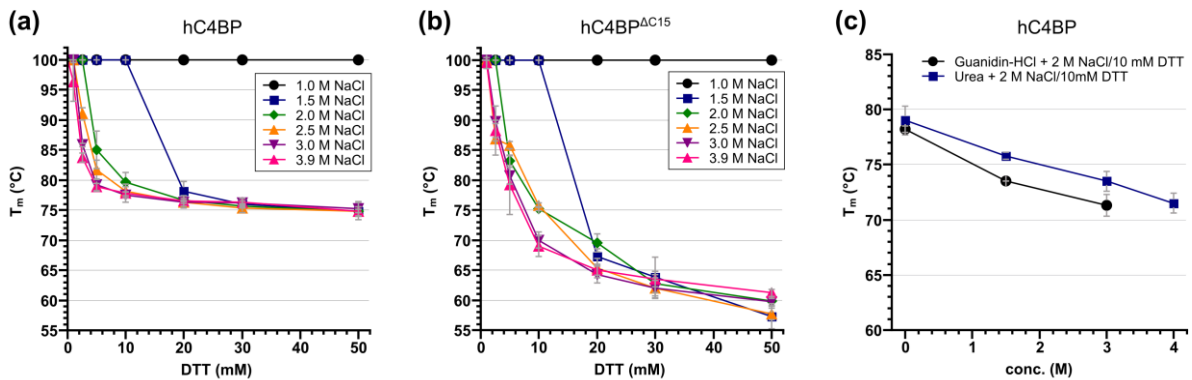
terminal um 15 Aminosäuren verkürzte Variante (hC4BP $\Delta$ C15) mit dieser Methode untersucht (Abb. 39).



**Abb. 39:** Graphischer Vergleich der mittels Thermofluor untersuchten C4BP-Varianten (a) Wildtyp und (b) C4BP $\Delta$ C15 jeweils in Auf- und Seitenansicht, Disulfidbrücken sind in Gelb eingezeichnet. (c) Sequenzvergleich der beiden Varianten, artifizielle Aminosäuren sind in Grau dargestellt.

Mit Hilfe dieser Experimente sollte zum einen die Stabilität des Wildtyp-Proteins untersucht werden und zum anderen der Beitrag des C-terminalen Bereiches von Helix H2 zur Gesamtstabilität (Abb. 40).





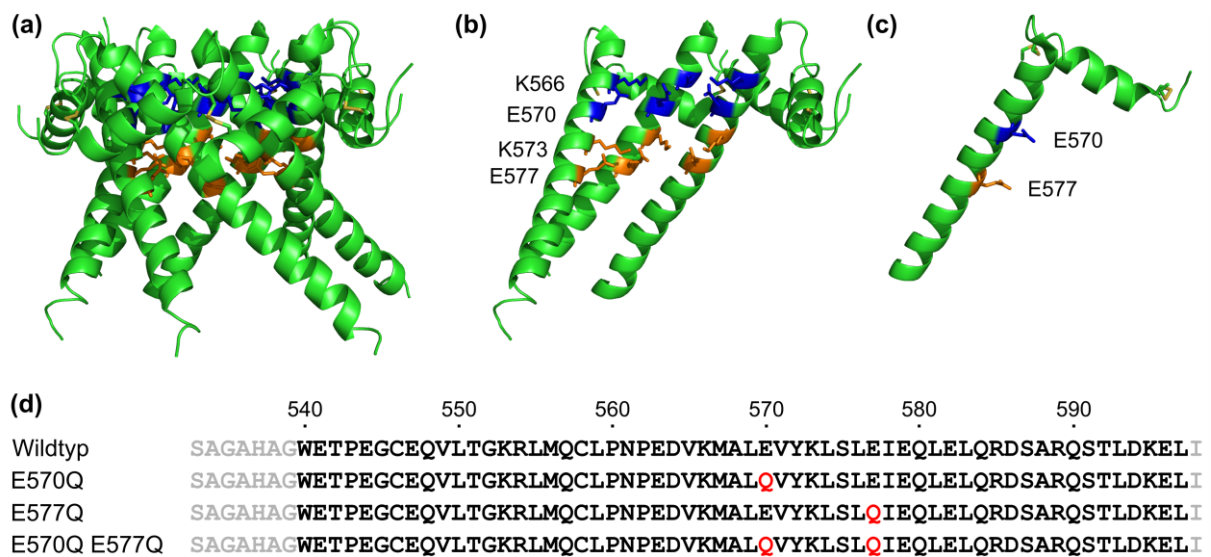
**Abb. 40:** Thermofluor-Messungen von (a) hC4BP und (b) hC4BP $\Delta$ C15. Die Schmelztemperaturen  $T_m$  der beiden Proteine sind in Abhängigkeit steigender NaCl und DTT Konzentrationen aufgetragen. Das Diagramm in (c) zeigt die Schmelztemperatur des hC4BP in Gegenwart steigender Guanidinhydrochlorid- (schwarze Kreise) bzw. Urea-Konzentrationen (blaue Vierecke) bei gleichzeitiger Anwesenheit von 2 M NaCl und 10 mM DTT. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Sowohl die Zugabe von DTT (bis zu 50 mM) als auch NaCl (bis zu 3,9 M) führten bei gleichzeitiger Erhitzung auf 99 °C zu keiner messbaren Zerstörung des Heptamers. Erst die Kombination von 3,9 M NaCl und 1 mM DTT bzw. 1,5 M NaCl und 20 mM DTT resultierte in einer messbaren Denaturierung und Schmelztemperaturen von 96 °C bzw. 78 °C (Abb. 40). Die stärkste Destabilisierung mit einer  $T_m$  von 75 °C konnte bei 3,9 M NaCl und 50 mM DTT beobachtet werden (Abb. 40 a). Somit scheint die Gesamtstabilität des Heptamers in einem intensiven Zusammenspiel der intermolekularen Wasserstoff-, Salz- und Disulfidbrücken begründet zu sein. Bei der C-terminal verkürzten Variante hC4BP $\Delta$ C15 (AS: 540 - 582), die nicht mehr über die innen gelegene Schicht aus Wasserstoffbrückenbindungen (Gln 480/ Gln 484), wohl aber über die weiter oben auf der Außenseite lokalisierte Klammer verfügt (Tyr 572/ Glu 582), kann daher bei Inkubation unter identischen Bedingungen eine um 10 °C bis 15 °C erniedrigte Schmelztemperatur beobachtet werden (Abb. 40 b). Eine Erhöhung der Salzkonzentration führte bei beiden Varianten zu erniedrigten  $T_m$ -Werten. Dieser Effekt kann mit einer Destabilisierung der beiden intermolekularen Salzbrückenringe zwischen den Helices H2 erklärt werden.

Aufgrund zu starker Hintergrundfluoreszenz von SYPRO Orange in Gegenwart hoher Konzentrationen von Guanidinhydrochlorid (>3 M) und Urea (>4 M) wurde die Konzentrationen der chaotropen Agentien nicht weiter erhöht. Durch die Inkubation von hC4BP in 3 M Guanidinhydrochlorid bzw. 4 M Urea in Kombination mit 2 M NaCl und 10 mM DTT wurden  $T_m$ -Werte um 71 °C gemessen, siehe Abb. 40 c. Mit den experimentell untersuchten Bedingungen wurde für das hC4BP eine minimale  $T_m$  von 71 °C gemessen, was wenn man den mesophilen

Ursprung dieses Proteins bedenkt, immer noch sehr hoch ist und die außergewöhnliche Stabilität dieser Struktur unterstreicht.

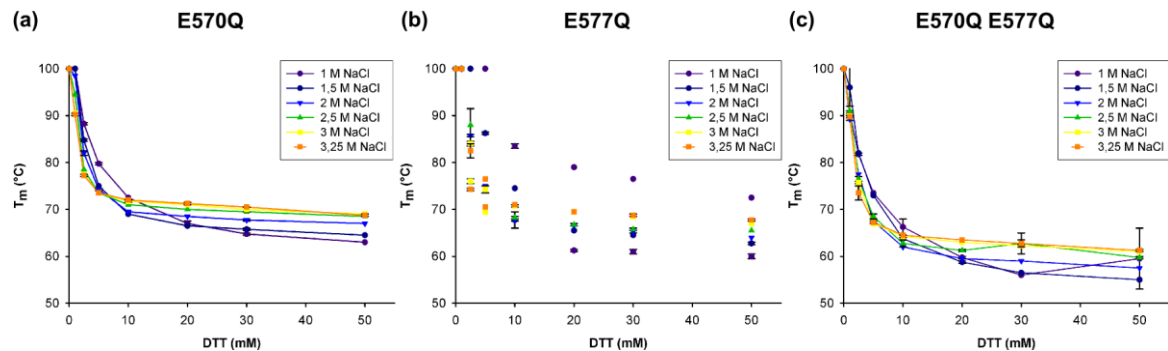
Es ist anzunehmen, dass die beiden internen Ringe aus ionischen Wechselwirkungen einen signifikanten Beitrag zur Gesamtstabilität der Oligomerisierungsdomäne leisten (Abb. 41). Um dies zu untersuchen wurden mittels PCR drei definierte Mutanten erzeugt: die Einzelmутanten E570Q bzw. E577Q und die Doppelmутante E570Q E577Q.



**Abb. 41:** Grafische Darstellung der beiden Ringe aus ionischen Wechselwirkungen im Bereich von Helix H2. Die involvierten Aminosäuren sind in Stäbchendarstellung gezeichnet, Ring A: blau, Ring B: orange, Disulfidbrücken in Gelb. (a) Im Kontext der kompletten Oligomerisierungsdomäne, (b) die vorderen 4 Monomere wurden aus Übersichtsgründen in diesem Bildabschnitt entfernt. (c) C4BP-Monomer, die Aminosäuren E570 und E577 sind farblich hervorgehoben. (d) Sequenzvergleich der erstellten Einfachmutanten E570Q, E577Q und der Doppelmутante E570Q E577Q. Die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren sind in Rot hervorgehoben.

Falls diese Aminosäuren einen stabilisierenden Einfluss auf die Oligomerisierungsdomäne ausüben, sollte eine Veränderung der involvierten Aminosäuren über den Verlust der ionischen Wechselwirkungen in einer Absenkung der Schmelztemperaturen resultieren. Unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide (2.3) und dem hC4BP Wildtyp-Plasmid als Matrize (2.2) wurden mit der PCR-Methode zur ortsgerichteten Modifikation von Plasmid-DNA (3.4.9) zunächst die C4BP-Einfachmutanten E570Q und E577Q angefertigt. Das Plasmid der sequenzierten Variante E570Q diente wiederum als Matrize zur Erzeugung der Doppelmутante E570Q E577Q. Die Produktion der drei Varianten wurde in dem *E. coli* Stamm Origami (DE3) durchgeführt. Die Reinigung der Varianten erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Die drei Mutanten wurden analog zum Wildtyp bzw. der C-terminal um 15 Aminosäuren verkürzten C4BP Variante im ThermoFluor untersucht (Abb. 42). Die Messungen wurden von Dr. Stefan Schmelz durchgeführt, die Auswertung der Daten erfolgte gemeinsam.





**Abb. 42:** Thermofluormessungen von (a) E570Q, (b) E577Q (aus Gründen der Übersicht wurden bei dieser Abbildung die einzelnen Messpunkte nicht verbunden) und (c) Doppelmutante E570Q E577Q. Die Schmelztemperaturen  $T_m$  sind in Abhängigkeit steigender NaCl und DTT Konzentrationen aufgetragen. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Bei allen drei Mutanten zeigen die Messungen eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant verminderte Stabilität (vergleiche Abb. 40), wobei die Einfachmutante E577Q mit einer um ca. 5 °C – 10 °C geringeren Schmelztemperatur noch am stabilsten ist. Bei der Doppelmutante E570Q E577Q beträgt die Differenz der  $T_m$ -Werte ähnlich wie bei der C-terminal verkürzten Variante zwischen 15 °C – 20 °C. Interessanterweise scheint es bei der E577Q-Mutante unter bestimmten Bedingungen zu einer zweistufigen Entfaltung zu kommen (1 M NaCl und 20 – 50 mM DTT, 1,5 M NaCl mit 10 mM DTT, 3M und 3,25 M NaCl mit 2,5 und 5 mM DTT). Möglicherweise wird hier im ersten Schmelzpunkt der ohnehin schon sehr bewegliche C-terminale Teil von Helix H2 aufgeschmolzen. Der zweite Schmelzpunkt bei 1 M NaCl und 50 mM DTT liegt mit 72,5 °C allerdings nur knapp unter dem  $T_m$  des Wildtyps.

#### 4.2.6 Weitere hc4BP Mutanten

Wie bereits einleitend erwähnt eignen sich das C4BP und dessen Derivate für eine Vielzahl unterschiedlicher biotechnologischer Anwendungen (1.3). Neben der Steigerung einer Immunantwort oder der *in vivo* Halbwertszeit ist die adäquate Positionierung der präsentierten Peptide und Protein ausschlaggebend für deren Wirkung. Für die effektive Aktivierung oder Inhibition eines ebenfalls oligomeren Zielproteins bspw. eines Rezeptors sollten die Präsentation der Peptide die Geometrie der Epitope imitieren. Die Orientierung der Effektorproteine im Raum kann z.B. durch Variation der Abstandhalter zwischen Grundgerüst und Effektor verändert werden.<sup>56</sup> Alternativ oder ergänzend könnte die Position der Effektorproteine über eine Veränderung des Oligomerisierungsgrades des Grundgerüsts beeinflusst werden.

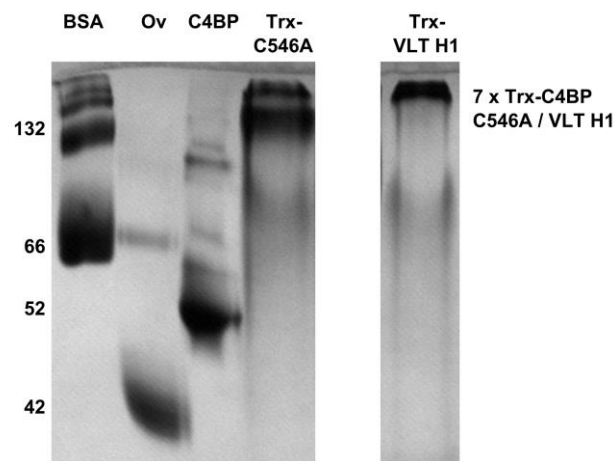
Mit gezielten Veränderungen im Bereich von Helix H1 wurde versucht die Anzahl der Untereinheiten der Oligomerisierungsdomäne zu beeinflussen (Abb. 43). Das Hauptaugenmerk

wurde hierbei auf die Position der beiden Cysteine gerichtet. Zunächst wurde das erste Cystein nach Alanin ausgetauscht (C546A), auf dieser Variante aufbauend wurde der Abstand zwischen den beiden Cysteinen verkürzt um ggf. ein verkleinertes Oligomer zu erzeugen (C546A/ V549C). Durch das Einfügen einer weiteren Helixwindung in die C-terminale Helix (H1 VLT) wurde versucht die Anzahl der oligomerisierten Untereinheiten zu erhöhen. Die Klonierung erfolgte mittels molekularbiologischer Standardmethoden (3.4) unter Zuhilfenahme der in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide.

	H1				H2			
	540	550	560	570	580	590		
Wildtyp	SAGAHAG	WETPEGCEQVLT . .	GKRLMQCLPNPEDVK	MALEVYKLSLEIEQ	LELQORDSARQSTL	DKELI		
C546A	SAGAHAG	WETPEGAEQVLT . .	GKRLMQCLPNPEDVK	MALEVYKLSLEIEQ	LELQORDSARQSTL	DKELI		
C546A V549C	SAGAHAG	WETPEGAEQCLT . .	GKRLMQCLPNPEDVK	MALEVYKLSLEIEQ	LELQORDSARQSTL	DKELI		
H1 VLT	SAGAHAG	WETPEGCEQVLT	VLTGKRLMQCLPNPEDVK	MALEVYKLSLEIEQ	LELQORDSARQSTL	DKELI		

**Abb. 43:** Aminosäuresequenzen der untersuchten Mutanten: Wildtyp, C546A, C546A V549C und H1 VLT. Ausgetauschte bzw. eingefügte Aminosäuren sind in Rot hervorgehoben. Die Nummerierung der Aminosäuresequenzen erfolgte nach der NCBI Referenzsequenz: NP\_000706.1 für die  $\alpha$ -Kette des humanen C4BP. Die Positionen der Helices H1 und H2 sind über der Nummerierung angegeben.

Die Proteinproduktion erfolgte in dem *E. coli*-Stamm Origami (DE3), die Zielproteine wurden lediglich über IMAC gereinigt (3.3.2), im Anschluss wurden die C4BP-Varianten mittels BN-PAGE auf ihre Oligomerisierungsfähigkeit untersucht (3.2.7). Mit dieser Elektrophorese-Methode können nicht kovalente Proteinkomplexe der Größe nach aufgetrennt werden. Anstelle des Detergenz SDS wird der ebenfalls negativ geladene Farbstoff Coomassie Brilliant G-250 verwendet um den Analyten eine negative Ladung zu verleihen. Des Weiteren wird bei dieser Methode vollständig auf denaturierende Agentien wie DTT und Urea verzichtet. In der durchgeführten BN-PAGE konnten keine Informationen über die Anzahl der Untereinheiten der beobachteten Oligomere gesammelt werden. Trotz der zum Teil gravierenden Eingriffe in die native Aminosäuresequenz schien die Oligomerisierungsfähigkeit nicht beeinträchtigt zu werden (Abb. 44). Sogar die Verlängerung von Helix H1 zeigte keine negative Auswirkung auf die Zusammenlagerung der Monomere zu einem übergeordneten Komplex.



**Abb. 44:** BN-PAGE (15 - 13% Acrylamid Gradient) der hC4BP-Mutanten. In den beiden ersten Spuren sind die Markerproteine BSA (66 kDa bzw. 132 kDa) und Ovalbumin (42 kDa) aufgetragen. In den benachbarten Spuren sind hC4BP (52 kDa) sowie die beiden Mutanten Trx-C546A und Trx-VLT H1 (jeweils mit 172 kDa bzw. 174 kDa) aufgetragen. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013<sup>41</sup>)

Alle drei Varianten (C546A V549C nicht gezeigt) konnten löslich in *E. coli* produziert werden. Den Daten der BN-PAGE-Analyse zufolge kommt den Disulfidbrücken bei der Assemblierung des Oligomers wenn überhaupt eine untergeordnete Rolle zu. Ausschlaggebend für eine effektive Initialisierung der Oligomerisierung sind demzufolge die C-terminalen Helices H2. Die Etablierung der intermolekularen Disulfidbrücken wird erst später realisiert. Des Weiteren scheint die Präsenz der Disulfidbrücken für die Aufrechterhaltung des Heptamers nicht notwendig zu sein, trotzdem wird ihre Ausbildung einen signifikanten Beitrag zu der Gesamtstabilität beitragen. Erst durch sie werden die benachbarten Monomere zu einem kovalenten Heptamer verbunden.

#### 4.2.7 Bioorthogonale Konjugation

Aufgrund ihres physiologischen Kontextes ist die C-terminale Oligomerisierungsdomäne des hC4BP geradezu prädestiniert als *scaffold*. Im Zuge der vorliegenden Arbeit sowie in zwei vorangegangenen Diplomarbeiten wurden diverse rekombinante Modifikationen an der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des hC4BP durchgeführt.<sup>172; 173</sup> Hierbei konnten allerdings nicht bei allen Konstrukten eine lösliche Produktion beobachtet werden. Eine Auswahl der untersuchten Fusionsproteine ist in Tabelle 18 zusammengestellt.

**Tabelle 18:** Zusammenstellung einer Auswahl von rekombinant modifizierten C4BP-Oligomerisierungsdomänen. Trx: Thioredoxin, cMyc: Epitop, AHNP: Anti-HER2/Neu Peptidmimetikum, MCoTI: *Momordica cochinchinensis* Trypsin Inhibitor, TNF $\alpha$ VHH: Tumornekrosefaktor- $\alpha$  variable heavy chain of a heavy chain antibody, CaM: Calmodulin, MW: Molekulargewicht, DSB: Anzahl der Disulfidbrücken.

Konstrukt	MW Monomer	DSB Heptamer ohne Trx	lösliche Expression
hC4BP wo Trx	12,4	7	+
Trx-hC4BP	24,6	7	+++
Trx-cMyc-hC4BP*	25,8	7	+++
Trx-AHNP-hC4BP*	26,1	7+7	+
Trx-MCoTI-hC4BP*	28,1	7+21	+
Trx-TNF $\alpha$ VHH-hC4BP	39,0	7+7	-
CaM-hC4BP	29,3	7	+
CaM-Trx-hC4BP	42,0	7	++
Trx-CaM-hC4BP	41,5	7	++
Trx-hC4BP-CaM	41,7	7	-

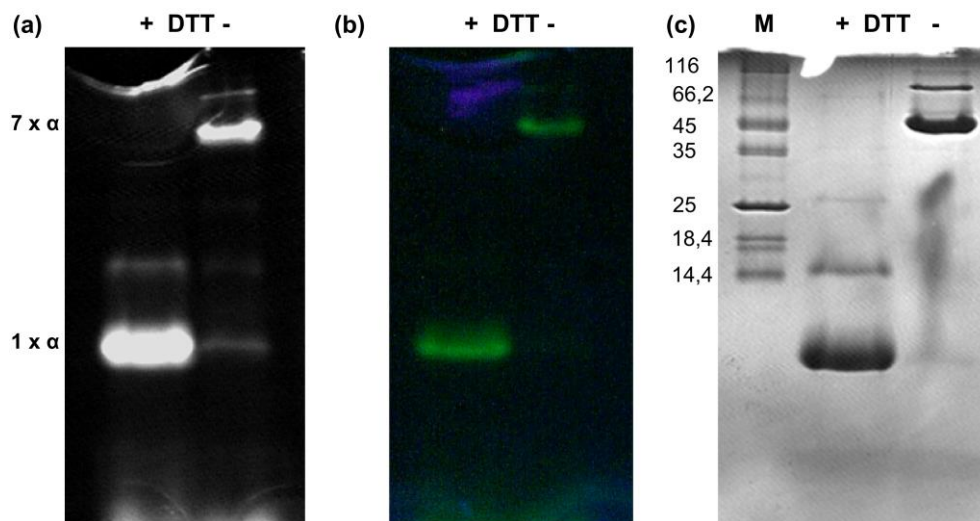
+++ : Produktion mit Ausbeuten im zweistelligen mg/L Bereich  
 ++ : Produktion mit Ausbeuten im einstelligen mg/L Bereich  
 + : Produktion möglich, geringe Ausbeute, hohe Verluste bei Reinigung  
 - : keine lösliche Produktion nachweisbar  
 \* : ebenfalls Klonierung und Produktion von Cystein Einfach- und Doppelmutanten

Eine erfolgreiche rekombinante Funktionalisierung der Oligomerisierungsdomäne ist sehr stark von der Art des Fusionspartners abhängig. Vor allem das Molekulargewicht, eine zunehmende Komplexität aber auch die Position des Fusionspartners beeinflussen hierbei das Ergebnis. Um diese Limitierung zu überwinden wurden Möglichkeiten evaluiert, die Oligomerisierungsdomäne einer posttranslationalen Funktionalisierung zugänglich zu machen. Hierdurch könnten nicht nur Konstrukte realisiert werden, die sich einer rekombinanten

Synthese kaum oder überhaupt nicht zugänglich gezeigt haben, sondern auch völlig neue Anwendungen eröffnet werden. Beispielsweise könnte das *scaffold* weiterhin mit guten Ausbeuten rekombinant in *E. coli* produziert werden. Mögliche Fusionspartner könnten ebenfalls in *E. coli*, einem anderen Expressionssystem oder vollsynthetisch bereitgestellt werden.

#### 4.2.7.1 N-terminale Modifikation mit FTSC

Über die Kopplung von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid wurde die Möglichkeit einer chemischen Modifizierung des C4bBP bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit untersucht.<sup>173</sup> Nach der Spaltung des TrxC4BP-Fusionsproteins mit TEV-Protease liegen an den N-Termini der C4BP-Untereinheiten Serine vor, welche nach Oxidation mit Natriumperiodat zur chemischen Kopplung (3.2.13) verwendet werden können. Hierdurch könnten Moleküle oder Peptide orthogonal mit der Oligomerisierungsdomäne verbunden werden. Das modifizierte Wildtyp-Protein wurde mittels SDS-PAGE analysiert, siehe Abb. 45. Zum Schutz des Fluorophors wurde die Elektrophorese unter Lichtausschluss durchgeführt. Für die anschließende Dokumentation wurden nacheinander verschiedene Techniken angewendet.



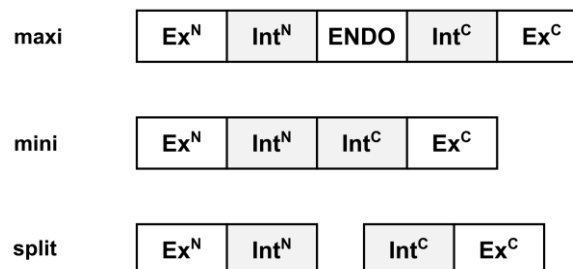
**Abb. 45:** SDS-PAGE zum Nachweis der Kopplung von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid an das C4BP-Heptamer. Der Probenauflauf erfolgte alternierend mit (+) und ohne (-) DDT. **(a)** Dieses Bild wurde mit dem Gel Jet Imager aufgenommen; **(b)** wurde mit einer 1,3 Megapixel-Digitalkamera fotografiert; **(c)** zeigt das Coomassie-gefärbte Gel. (Modifiziert nach Diplomarbeit Thomas Hofmeyer<sup>173</sup>)

In Abb. 45 (a) erfolgte die Anregung des Fluorophors mit Licht der Wellenlänge 312 nm. In (b) wurde eine UV-Handlampe (245 nm/ 366 nm) zur Anregung des Fluorophors verwendet. Nach der Coomassie-Färbung des Gels (c), war keine Fluoreszenz mehr zu erkennen. Es konnte eine chemische Kopplung von Fluorescein-5-Thiosemicarbazid mit dem N-terminalen Serin der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des C4BP gezeigt werden.

In weiteren Experimenten wurde versucht, das oxidierte N-terminale Serin mit einem Alkin bzw. Azid tragenden Linker zu modifizieren. Die hierbei verwendeten Reaktionsbedingungen erwiesen sich jedoch als nicht zielführend (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz vorerst nicht weiter verfolgt, sondern andere Möglichkeiten der *in vitro*-Modifikation in Betracht gezogen.

#### 4.2.7.2 Modifikation durch Protein-Spleißen mit *split*-Inteinen in *trans*

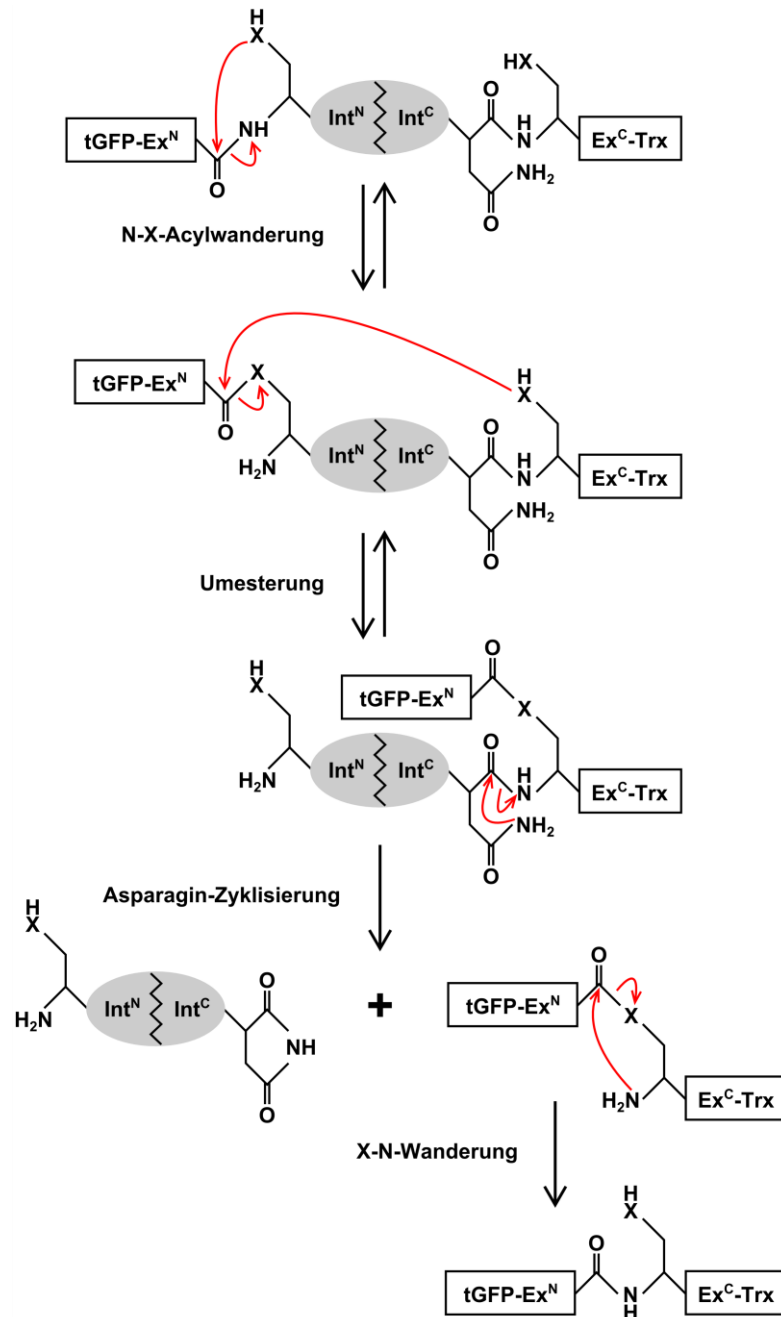
Inteine sind sogenannte *selfish or parasitic genetic elements* die *in-frame* zusammen mit einem *host*-Protein translatiert werden.<sup>191</sup> Diese Präkursor-Proteine spalten sich in einer autokatalytischen Spleiß-Reaktion in das *host*-Protein und das Intein. Inteine wurden bei Eukaryoten, Bakterien und Archaea beobachtet, sind also für alle drei Reiche beschrieben.<sup>192</sup> Sie existieren in einer von drei unterschiedlichen Organisationsformen (Abb. 46). Bei den maxi-Inteinen ist in die Spleiß-Domäne eine DNA-Homing-Endonuklease eingebettet. Mit Hilfe dieser Endonuklease kann eine spezifische Transposition des Intein-Gens in ein freies, verwandtes Allel erfolgen. Die mini-Inteine enthalten keine Endonuklease, verfügen also über eine kontinuierliche Spleiß-Domäne. Bei den *split*-Inteinen ist die Spleiß-Domäne gespalten und liegt fusioniert mit den entsprechenden Exteinen in Form von zwei getrennten Proteinen vor.



**Abb. 46:** Schematischer Aufbau der drei vorkommenden Intein-Typen: maxi, mini und split. Die Bezeichnungen Intein und Extein setzen sich aus den Worten intern bzw. extern und Protein zusammen.  $Ex^N$  und  $Ex^C$ : N- bzw. C-terminale Exteine,  $Int^N$  und  $Int^C$ : N- bzw. C-terminale Inteine, ENDO: DNA Homing-Endonuklease. (Modifiziert nach Volkmann und Motz 2013)

Das Protein-Spleißen in *trans* mittels *split*-Inteinen ist ein posttranslationaler Vorgang, bei dem eine Aminosäuresequenz (Intein:  $Int^N$ ,  $Int^C$ ) autokatalytisch aus dem Komplex geschnitten wird und unmittelbar darauf, die entstehenden Fragmente an den flankierenden Bereichen (Exteine:  $Ex^N$ ,  $Ex^C$ ) über eine Peptidbindung neu verknüpft werden.<sup>193</sup> Mit dieser Methode ist es beispielsweise möglich, *in vitro* posttranslational am N-Terminus eines Proteins kovalent andere Proteine oder synthetische Peptide zu befestigen.<sup>194</sup> In der folgenden Abbildung (Abb. 47) wird

der zugrunde liegende Mechanismus schematisch anhand der Ligation der beiden Modellproteine *turbo Green Fluorescent Protein* (tGFP) und Thioredoxin (Trx) veranschaulicht.

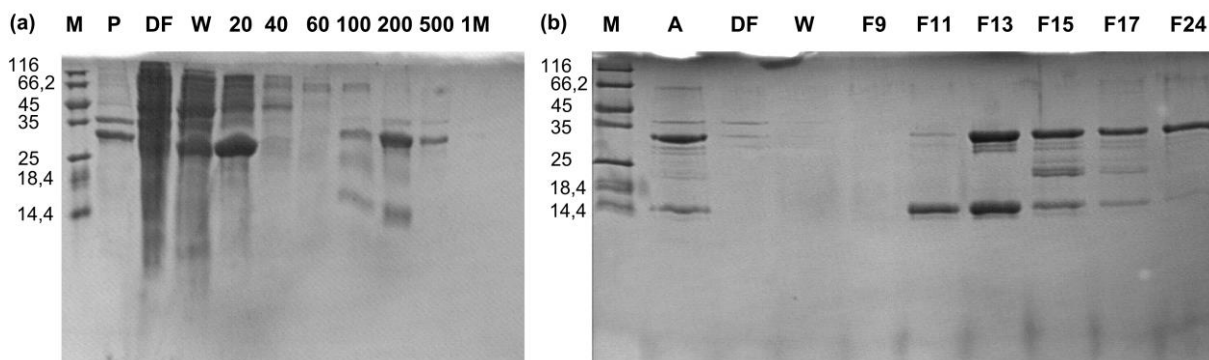


**Abb. 47:** Schematische Darstellung des Standard Protein-Spleiß Mechanismus. Durch die Zusammenlagerung von  $\text{Int}^N$  und  $\text{Int}^C$  wird der Spleiß-Prozess eingeleitet. Nach den vier dargestellten Reaktionen wird Intein ( $\text{Int}^N\text{Int}^C$ ) aus dem Protein ausgeschnitten und zwischen den beiden Exteinen ( $\text{Ex}^N$  und  $\text{Ex}^C$ ) eine neue Peptidbindung geknüpft. Details siehe Text. X: Sauerstoff oder Schwefelatom der ersten Aminosäure von  $\text{Int}^N$ : Ser, Cys bzw. erste Aminosäure von  $\text{Ex}^C$ : Ser, Cys oder Thr. (Modifiziert nach Xu *et al.* 1996 und Volkmann & Mootz 2013<sup>195; 196</sup>)



Nach der Zusammenlagerung von Int<sup>N</sup> und Int<sup>C</sup> wird die Reaktion über den nukleophilen Angriff einer Hydroxy- oder Thiolgruppe (Serin oder Cystein) von Int<sup>N</sup> auf seine eigene Peptidbindung zu Ex<sup>N</sup> eingeleitet, wobei zwischenzeitlich ein Thio- bzw. Oxoester entsteht. Im zweiten Schritt erfolgt eine Umesterung der Acylgruppe von Ex<sup>N</sup> auf die erste Aminosäure (Ser, Cys, Thr) von Ex<sup>C</sup>. Die Amidgruppe eines benachbarten Asparaginrestes greift daraufhin seine eigene Carbonylgruppe an und bildet ein Succinimid wobei die Peptidbindung zwischen Int<sup>C</sup> und Ex<sup>C</sup> gespalten wird. Abschließend lagert sich der Thio- bzw. Oxoester zwischen Ex<sup>N</sup> und Ex<sup>C</sup> zu einer thermodynamisch günstigeren Peptidbindung um.<sup>196</sup>

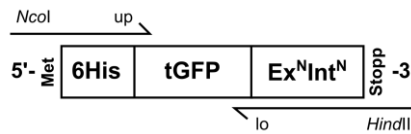
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Protein-Spleißen in *trans* in der Arbeitsgruppe etabliert. Hierzu wurden zwei Konstrukte benötigt. Dies waren die beiden getrennten Inteine Int<sup>C</sup>-Trx (275 AS) und tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> (256 AS). Der Plasmid pIT021 mit dem Konstrukt Int<sup>C</sup>-Trx (Int<sup>C</sup> ist das 143 AS-Fragment der *Synechocystis spp.* DnaB-Helicase) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Mootz zur Verfügung gestellt und wurde unverändert verwendet.<sup>197</sup> Die Proteinproduktion wurde in BL21 (DE3) bei 37 °C begonnen, die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 mit 0,4 mM IPTG für 3 h bei 30 °C. Nach dem Zellaufschluss wurde die Reinigung mittels IMAC (3.3.2) und Ionenaustauschchromatographie (3.3.4) durchgeführt (Abb. 48).



**Abb. 48:** SDS-Gele der chromatographischen Reinigung von Int<sup>C</sup>-Trx. **(a)** SDS-PAGE mit IMAC-Fractionen. P: Pellet, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, Imidazolkonzentrationen in mM. Die Fraktionen 200 mM und 500 mM wurden vereinigt und über Nacht gegen 5 L AIX Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,25 mit 2 mM DTT) dialysiert. **(b)** SDS-PAGE des AIX mit einer 1 mL HiTrap Q HP-Säule. Die Elution erfolgte mit AIX Puffer + 500 mM NaCl. A: Auftrag, DF und W siehe (a), F9-F24: gesammelte Fraktionen.

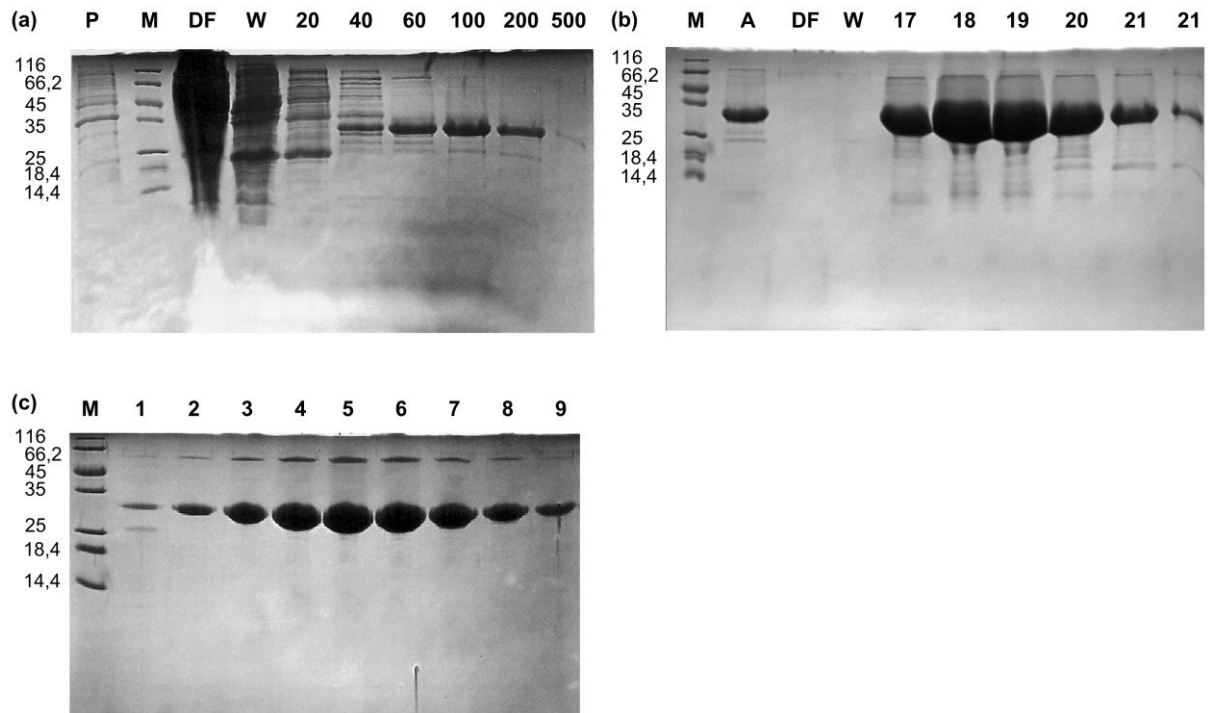
Die Fraktionen F21-F27 der Ionenaustauschchromatographie wurden vereinigt und über Nacht gegen Reaktionspuffer dialysiert. Im Anschluss wurde das Protein aliquotiert, schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Klonierung des Konstrukts pET28a 6His tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> (Abb. 49) und die anschließende Reinigung des Proteins wurde in Zusammenarbeit mit Carolin P. Mai durchgeführt.



**Abb. 49:** Schematische Darstellung der 6His-tGFP Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> Klonierung. Das Plasmid pET32a-tGFP diente als Matrize, über die *up* und *lo* Oligos wurden das 6His-Epitop, Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> sowie die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* an die für tGFP codierende Sequenz angefügt.

Als Matrize der PCR-Reaktion diente das Plasmid pET32a-tGFP. In der PCR-Reaktion wurden über die entsprechenden *up* und *lo* Primer (Tabelle 2.3) am 5'-Ende eine *NcoI*-Erkennungsstelle und der 6His-Epitop bzw. am 3'-Ende Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> (KKESG-CISGDSLISLA)<sup>197</sup> sowie die Restriktionsschnittstelle *HindIII* angefügt. Das PCR-Produkt sowie das Expressionsplasmid pET28a wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* gespalten (3.4.3), aus einem Agarosegel eluiert (3.4.5) und ligiert (3.4.6). Die Plasmid-DNA des Ligationsansatzes wurde mit Ammoniumacetat und Ethanol gefällt (3.4.2) und zur Transformation von elektrokompenten *E. coli* Top10 Zellen verwendet (3.1.5). Die Identifikation positiver Klone erfolgte mittels Kolonie-PCR (3.4.8) und das fertige Konstrukt wurde durch Sequenzierung verifiziert. Die Expression wurde in *E. coli* Rosetta (DE3) durchgeführt. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> = 0,5 mit 0,5 mM IPTG und wurde über Nacht bei 30 °C aufrechterhalten. Die Reinigung von tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> wurde analog zu Int<sup>C</sup>-Trx durchgeführt (Abb. 50). Aufgrund stärkerer Kontaminationen nach der Anionenaustauschchromatographie wurde das Protein abschließend mittels SEC gereinigt. Bei diesem Schritt wurde das Protein gleichzeitig in den Reaktionspuffer überführt (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerin und 2 mM DTT).



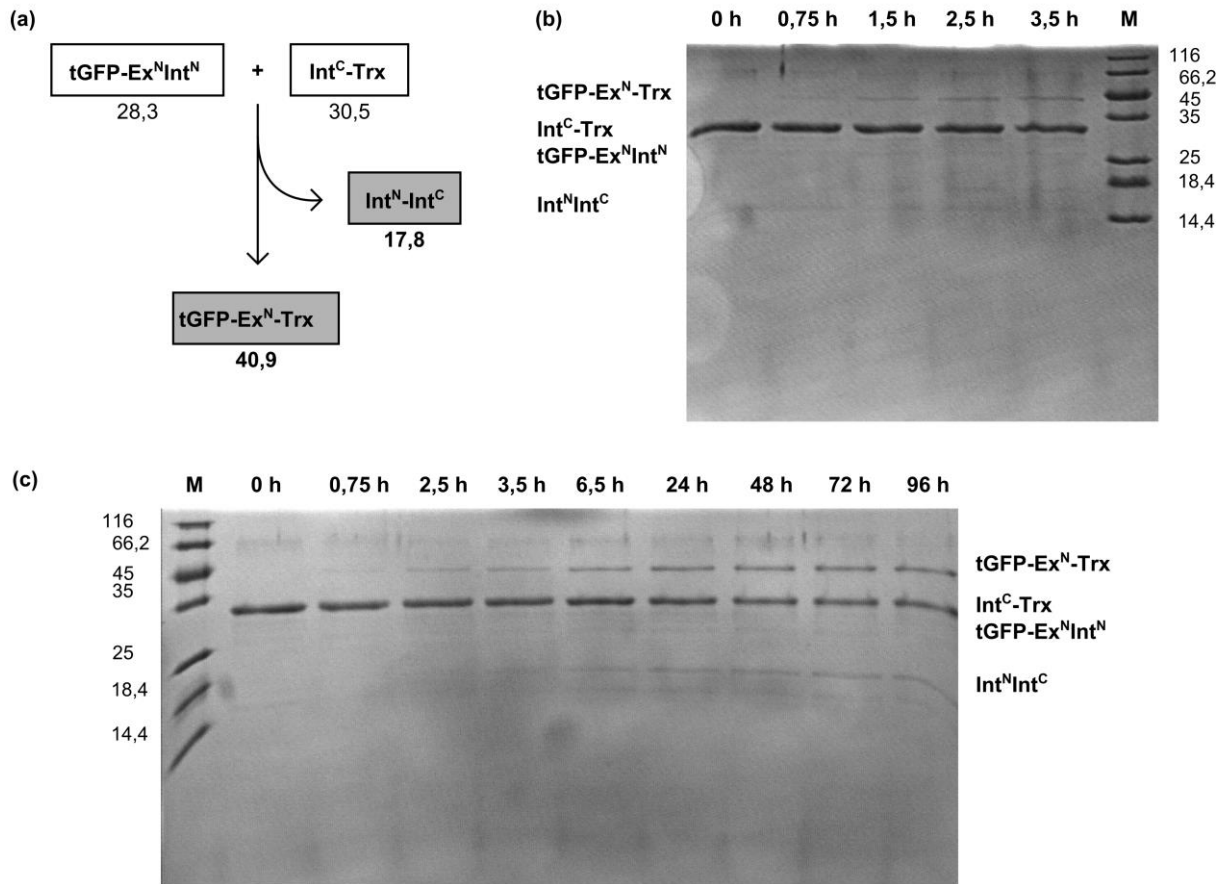
**Abb. 50:** SDS-PAGEs der chromatographischen Reinigung von tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> (a) IMAC-Fractionen P: Pellet, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, Imidazolkonzentrationen in mM. Die Fraktionen 60 mM, 100 mM und 200 mM wurden vereinigt und über Nacht gegen 5 L AIX Puffer dialysiert (b) AIX HiTrap Q HP, Beschriftung siehe Abb. 48. (c) SEC mit Superdex 75 pg 16/60, Fraktionen F1-F9 aufgetragen.

Das gereinigte Protein wurde ebenfalls aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Mit Aliquots der Proteine wurden sofort Spleißversuche unternommen, die Molekulargewichte der eingesetzten und erwarteten Proteine sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

**Tabelle 19:** Zusammenfassung der eingesetzten Proteine und der beim Spleißen zu erwartenden Fragmente. Alle Angaben in kDa, die Molekulargewichte des Produktes (tGFP-Ex<sup>N</sup>-Trx) sowie der Fragmente aus denen es aufgebaut ist (tGFP-Ex<sup>N</sup> und Trx) sind hervorgehoben, die restlichen Fragmente sind eingeklammert (Int<sup>N</sup>Int<sup>C</sup>).

Edukte	Zwischenprodukte	Produkte
tGFP-Ex <sup>N</sup> Int <sup>N</sup>	(28,3)	27,2 (1,1)
Int <sup>C</sup> -Trx	(30,5)	13,7 (16,6)
		40,9 (17,8)

In Abb. 51 (a) ist eine vereinfachte Darstellung der Spleiß-Reaktion abgebildet. Es wurden jeweils 0,5 mg der Proteine gemischt und zunächst bei RT, später bei 4 °C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben genommen und später gemeinsam mittels SDS-PAGE analysiert, siehe Abb. 51 (b) RT und (c) 4 °C.



**Abb. 51:** *In vitro* Spleiß-Reaktion (a) Schematische Darstellung der eingesetzten Edukte (weiß hinterlegt) und der zu erwartenden Produkte (grau), alle Angaben in kDa. SDS-PAGEs mit Proben der Spleiß-Reaktion zwischen tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> und Int<sup>C</sup>-Trx bei (b) RT und (c) 4 °C, die Reaktionsdauer ist in Stunden angegeben. Die beiden Edukte Int<sup>C</sup>-Trx (30,5 kDa) und tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> (28,3 kDa) unterscheiden sich in MW und Laufverhalten nur unzureichend und sind daher im Gel nicht voneinander zu unterscheiden. Mit zunehmender Inkubationsdauer findet die Akkumulation der Spleißprodukte statt: tGFP-Ex<sup>N</sup>-Trx (40,9 kDa) und Int<sup>N</sup>Int<sup>C</sup> 17,9 kDa.

Unter den gewählten Bedingungen konnten bereits nach wenigen Stunden erste Produkte der Spleiß-Reaktion beobachtet werden, siehe Abb. 51 (b). Eine Verlängerung der Inkubationszeit scheint sich positiv auf die Reaktion auszuwirken. Ein vollständiger Umsatz der Edukte konnte allerdings auch bei einer sehr langen Inkubation von vier Tagen nicht erzielt werden (Abb. 51 c).

#### 4.2.8 Diskussion

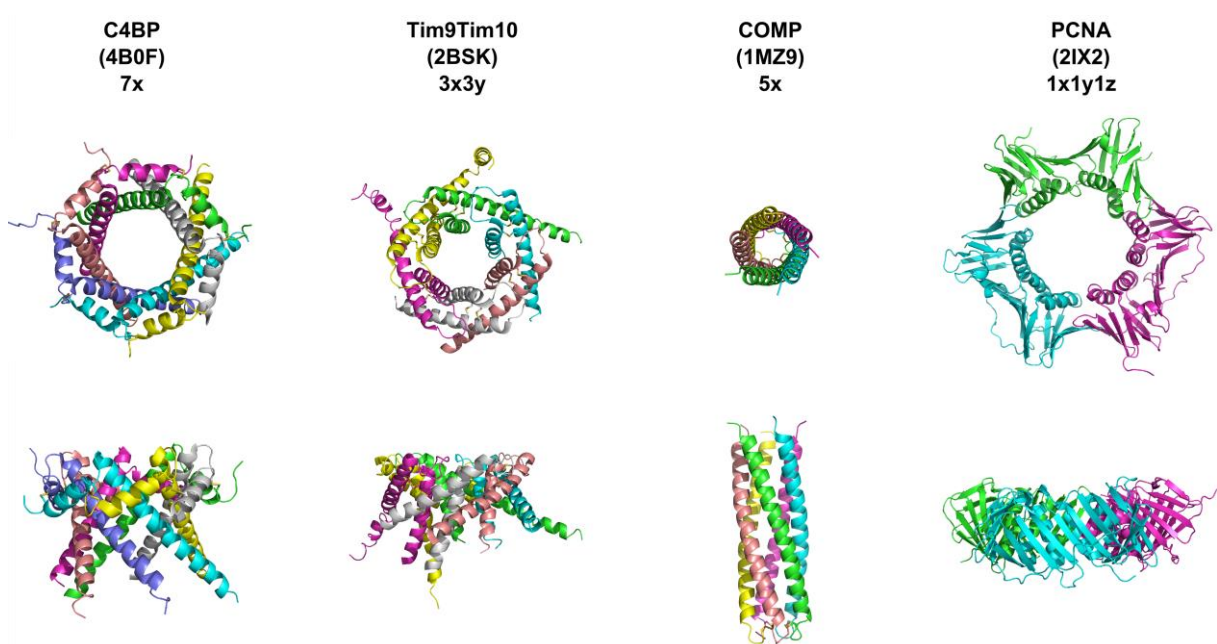
In der Literatur wurde bereits von einer erhöhten Stabilität und von einer beeindruckenden Haltbarkeit von nativem C4BP bzw. C4BP-Fusionsproteinen berichtet.<sup>188</sup> Um diese Stabilität näher zu untersuchen wurde das Wildtyp-Protein im CD-Spektroskop gemessen. Eine Veränderung der Sekundärstruktur war bis zum Limit des untersuchten Temperaturgradienten bei 100 °C nicht nachweisbar. Eine zusätzliche Denaturierung mittels chaotroper Agentien war

mit dem zur Verfügung stehenden Gerät nicht möglich, daher wurden in nachfolgenden Experimenten das Wildtyp-Protein und die C-terminal verkürzte Variante hC4BP<sup>ΔC15</sup> mittels Thermofluor weiter untersucht. Beide Varianten waren bei 1 M NaCl, 50 mM DTT und 100 °C vollständig gefaltet. Eine erste Absenkung der  $T_m$ -Werte konnten durch die weitere Zugabe von 0,5 M NaCl bei 20 mM DTT beobachtet werden. Die C-terminal verkürzte Variante zeigte daraufhin eine um ca. 15 °C geringere  $T_m$  im Vergleich zum Wildtyp. Die bei diesem Experiment tiefsten  $T_m$ -Werte lagen für den Wildtyp bei 75 °C und für die verkürzte Variante bei 60 °C. Es kann festgehalten werden, dass der fehlende Bereich von Helix H2 keine Bedeutung für die Assemblierung des Oligomers hat, wohl aber einen signifikanten Beitrag zur Gesamtstabilität leistet.

Mit drei weiteren hC4BP-Wildtyp-Mutanten wurde die Rolle der intermolekularen Salzbrückenringe zwischen den Helices H2 für die Gesamtstabilität untersucht. Ein deutlicher Unterschied zu den vorangegangenen  $T_m$ -Untersuchungen (Wildtyp, hC4BP<sup>ΔC15</sup>) ist der frühe Einbruch der Schmelzkurven bei relativ geringen Konzentrationen destabilisierender Agenzien. Prinzipiell spricht das für einen signifikanten Beitrag der ausgetauschten Aminosäuren zur Gesamtstabilität. Bemerkenswert ist das Auftreten einer zweistufigen Denaturierung der E577Q Mutante unter definierten Bedingungen. Beispielsweise in 1 M NaCl, 20 mM DTT denaturiert diese Variante über zwei diskrete Schmelzpunkte (61,25 °C und 79 °C). Möglicherweise ist in dieser Variante der C-terminale Abschnitt von Helix H2 durch den Aminosäureaustausch derart von den restlichen stabilisierenden Kräften getrennt, dass er von diesen nicht mehr profitieren kann. Als Konsequenz schmilzt dieser Bereich wahrscheinlich zuerst, bevor der Rest der Oligomerisierungsdomäne schmilzt, unter Bedingungen die bei dem Wildtypprotein keine Denaturierung verursachen konnten. Zusammenfassend lässt sich einerseits feststellen, dass jede Modifikation im Vergleich zum Wildtyp zu verringerten  $T_m$ -Werten geführt hat. Auf der anderen Seite sind diese verringerten  $T_m$ -Werte, bedenkt man den mesophilen Ursprung dieser Struktur, immer noch recht hoch. Darüber hinaus blieb bei allen Mutanten die Fähigkeit zur Oligomerisierung erhalten. Hier scheint das Zusammenspiel der relativ vielen kovalenten und nichtkovalenten inter- und intramolekularen Bindungen das Oligomer in die Lage zu versetzen, die zum Teil massiven Veränderungen zu kompensieren.

Ein Vergleich mit anderen Oligomerisierungsdomänen ist schwierig, da das humane C4BP und das homologe Protein aus *G. gallus* die einzigen Disulfid-verbrückten Homoheptamere sind die in der Proteindatenbank hinterlegt sind, trotzdem soll im folgenden Abschnitt eine gewisse Einordnung unternommen werden. Strukturell sehr ähnlich und gleichzeitig völlig verschieden ist bspw. der hexamere Tim9Tim10 Komplex (*translocase of the inner mitochondrial membrane* aus *H. sapiens*), siehe Abb. 52.<sup>198</sup> Dieses Heterohexamer hat im mitochondrialen

Intermembranraum eine Chaperon-ähnliche Funktion bei der Passage von hydrophoben Präkursor-Proteinen. Ähnlich der C4BP-Oligomerisierungsdomäne bestehen seine Untereinheiten aus je zwei über einen Loop verbundene Helices. Abweichend vom C4BP werden zwischen diesen beiden Helices jeweils zwei intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet, die Polymerisation der Untereinheiten erfolgt hauptsächlich über Salzbrücken zu den benachbarten Untereinheiten.



**Abb. 52:** Vergleich der Oligomerisierungsdomänen: C4BP, Tim9Tim10, COMP und PCNA. Die Proteine sind in der oberen Zeile in der Aufsicht, darunter in der Seitenansicht abgebildet (C-Terminus unten). Die Abbildung wurde mit PyMOL generiert, Farbgebung: *color by chain*, Disulfidbrücken in Gelb, Komposition der Untereinheiten: nx: Homooligomer, nxny und xyz Heterooligomere. PDB IDs: 4B0F, 2BSK, 1MZ9, 2IX2.

Hieraus ergibt sich äußerlich betrachtet eine sehr ähnliche Struktur, die aber im Inneren völlig anders organisiert ist. Eine vergleichsweise minimalistische Oligomerisierungsdomäne ist dagegen das COMP-Protein (*cartilage oligomeric matrix protein* aus *H. sapiens*), dessen *coiled-coil* Oligomerisierungsmotiv in diversen extrazellulären Proteinen vorkommt.<sup>199</sup> Prinzipiell besteht dieses Protein aus fünf parallelen Helices die am C-Terminus kovalent über fünf Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.<sup>200</sup> Rekombinant konnten an diese Oligomerisierungsdomäne sowohl N- als auch C-terminal Antikörperfragmente angefügt werden.<sup>201</sup> Ein weiteres Oligomer das ebenfalls als *scaffold*-Protein erforscht wird, ist das Trimer PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Dieses ringförmige, symmetrische Protein assembliert sich normalerweise nichtkovalent um dsDNA und dient anderen DNA-assoziierten Proteinen als Ankerpunkt.<sup>202</sup> Um als rigideres *scaffold* für molekularbiologische Anwendungen zu dienen wurden in eine



heterotrimeren, nichtkovalente PCNA-Variante aus *Sulfolobus solfataricus* drei intermolekulare Disulfidbrücken eingebracht.<sup>16; 203</sup> Durch die damit unterbundene Dissoziation der Untereinheiten konnte der Substratumsatz von drei rekombinant an den Untereinheiten befestigten Enzymen signifikant gesteigert werden.

Bereits 2002 wurde von Kask *et al.* der für die Assemblierung der C4BP-Oligomerisierungsdomäne essentielle Bereich grob eingegrenzt.<sup>42</sup> Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte dieser Bereich weiter eingengt werden. Eine C-terminale Verkürzung zwischen 11 und 15 Aminosäuren wird problemlos toleriert. Bei einer weiteren Verkürzung sind immer weniger Monomere in der Lage Oligomere zu bilden (hC4BP<sup>ΔC20</sup>). In weiterführenden Experimenten könnten sukzessive die nächsten fünf C-terminalen Aminosäuren entfernt werden um diesen Bereich noch genauer aufzulösen. Ab einer Deletion von 27 Aminosäuren ist keine nennenswerte Oligomerisierung mehr feststellbar.

Mit drei Mutanten (VLT H1, C546A und C546A/V549C) wurden Modifikationen im Bereich von Helix H1 eingebracht. Hiermit wurde versucht, über die Veränderung der Positionen der Cysteine Einfluss auf die Anzahl der oligomerisierten Untereinheiten zu nehmen. Dieses Ziel konnte nicht erreicht werden, allerdings zeigten diese Mutationen erneut die sehr große Toleranz der Oligomerisierungsdomäne gegenüber zum Teil drastischen Modifikationen. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken erst im späteren Verlauf der Oligomerisierung stattfindet und für diese nicht zwingend erforderlich ist. Wenn man diese Information mit der Erkenntnis verbindet, dass die Assemblierung über die C-terminalen Helices H2 initiiert wird, wäre es interessant eine Variante der Oligomerisierungsdomäne komplett ohne H1 zu erzeugen. In einer Publikation aus dem Jahr 2006 wird eine vom GCN4 Leucin-Zipper abgeleitete Struktur vorgestellt die als 7 Helix Coiled-Coil beschrieben wird.<sup>204</sup> Interessanterweise wird für diese Struktur trotz nicht kovalenter Verknüpfung der Monomere mit einem  $T_m$  von ~95 °C ebenfalls eine sehr hohe Schmelztemperatur beobachtet.

Des Weiteren wurde die hC4BP<sup>ΔC15</sup>-Variante der Oligomerisierungsdomäne ebenfalls vom N-Terminus her verkürzt. In einer ersten Mutante wurde der sechs Aminosäuren lange artifizielle Linker zwischen TEV-Erkennungsstelle und Wildtypsequenz entfernt. In der zweiten Mutante wurden die ersten sechs Aminosäuren der Wildtypsequenz deletiert. Diese Verkürzungen hatten keinen negativen Einfluss auf die Oligomerisierungsfähigkeit. Insgesamt konnte damit eine funktionelle Oligomerisierungsdomäne erzeugt werden, die je Monomer lediglich aus 38 Aminosäuren besteht. Diese drastische verkürzte Minimalversion eröffnet die Möglichkeit der vollsynthetischen Produktion mittels SPPS. Durch eine vollsynthetische Herstellung der



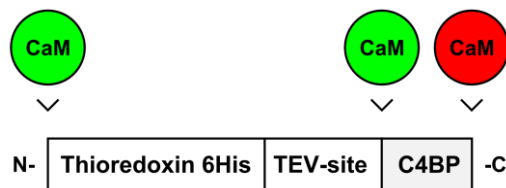
Oligomerisierungsdomäne in Verbindung mit der Strukturinformation ergeben sich hochinteressante Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise können definiert nichtkanonische Aminosäuren in das *scaffold* eingebracht werden. Mit diesen Aminosäuren können diverse funktionelle Gruppen mit der Oligomerisierungsdomäne konjugiert werden. Zum einen könnten damit *in vitro* gezielt biologisch aktive Peptide und Proteine auf der Oberfläche der Oligomerisierungsdomäne arrangiert werden, die in einer rekombinanten Produktion nicht zugänglich sind. Zum anderen wäre es ebenfalls interessant, mittels SPPS das *scaffold* teilweise oder vollständig aus D-Aminosäuren zu synthetisieren. Bereits durch die Substitution einiger weniger Aminosäuren an N- und C-Terminus kann eine drastisch erhöhte Serumstabilität induziert werden.<sup>205</sup> Des Weiteren könnte durch den Austausch von L- nach D-Aminosäuren eine Immunantwort gegen das *scaffold* minimiert oder sogar vollständig unterdrückt werden.<sup>206</sup> Die Verwendung von D-Peptiden in einer L-Biosphäre sollte generell durch einen erschwerten proteolytischen Abbau zu einer verbesserten *in vivo* Persistenz führen. Dieser erschwerte Abbau könnte bspw. über die verlängerte Präsentation von Antigenfragmenten auf APCs in einer verstärkten Immunantwort resultieren.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die lösliche Produktion der hC4BP Oligomerisierungsdomäne nicht zwingend als Thioredoxin-Fusion erfolgen, bzw. in *E. coli* Stämmen mit weniger reduzierendem Cytoplasmamilieu stattfinden muss. Eine Produktion ohne Trx ist möglich, führt allerdings zu wesentlich geringeren Ausbeuten. Der in Abschnitt 4.1.4 verwendete Stamm B834 (DE3) lieferte trotz reduzierendem Cytoplasmamilieu korrekt Disulfid-verbrücktes Protein. Wahrscheinlich ist der Luftsauerstoff beim Aufschluss der Zellen mittels French-Press für die Oxidation der Disulfidbrücken ausreichend. Diese Beobachtung deckt sich mit zwei Publikationen in denen ebenfalls Disulfidbrücken-haltiges C4BP-Oligomer durch cytoplasmatische Produktion in *E. coli* hergestellt wurde.<sup>17; 59</sup> Es ist anzunehmen, dass das Heptamer aufgrund der C-terminal initiierten Assemblierung zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses bereits gefaltet vorliegt und sich die korrespondierenden Thiolgruppen in räumlicher Nähe befinden.

Bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit wurde damit begonnen diverse C4BP-Fusionsproteine rekombinant herzustellen. Bei diesen Experimenten wurden neben den Möglichkeiten einer rekombinanten Produktion von Fusionsproteinen in *E. coli* auch deren Grenzen aufgezeigt. Beispielsweise korrelieren die Ausbeuten sehr stark mit der Komplexität bzw. Größe des Fusionsproteins. Kleine Peptide und Proteine werden prinzipiell besser toleriert, wobei mit zunehmender Komplexität (z.B.: AHNP, MCoTI) ein signifikanter Rückgang der Ausbeuten zu beobachten ist. Bei der Funktionalisierung mit einer VHH-Domäne (antiTNF $\alpha$ ) war keine lösliche Produktion mehr nachweisbar. Dagegen wurde in einer Publikation von Wang

et al. 2013 von der erfolgreichen cytoplasmatischen Produktion eines VHH-C4BP-Fusionsproteins in *E. coli* BL21 berichtet.<sup>17</sup> Es ist anzunehmen, dass die Primärsequenz des fusionierten Antikörperfragmentes erheblichen Einfluss auf die Expressionsrate hat.<sup>12</sup>

Im Rahmen der Diplomarbeit von Carmen Feinweber wurden rekombinant Calmodulin-Domänen (CaM) an verschiedenen Stellen des Trx-C4BP-Fusionsproteins eingebracht (Abb. 53).



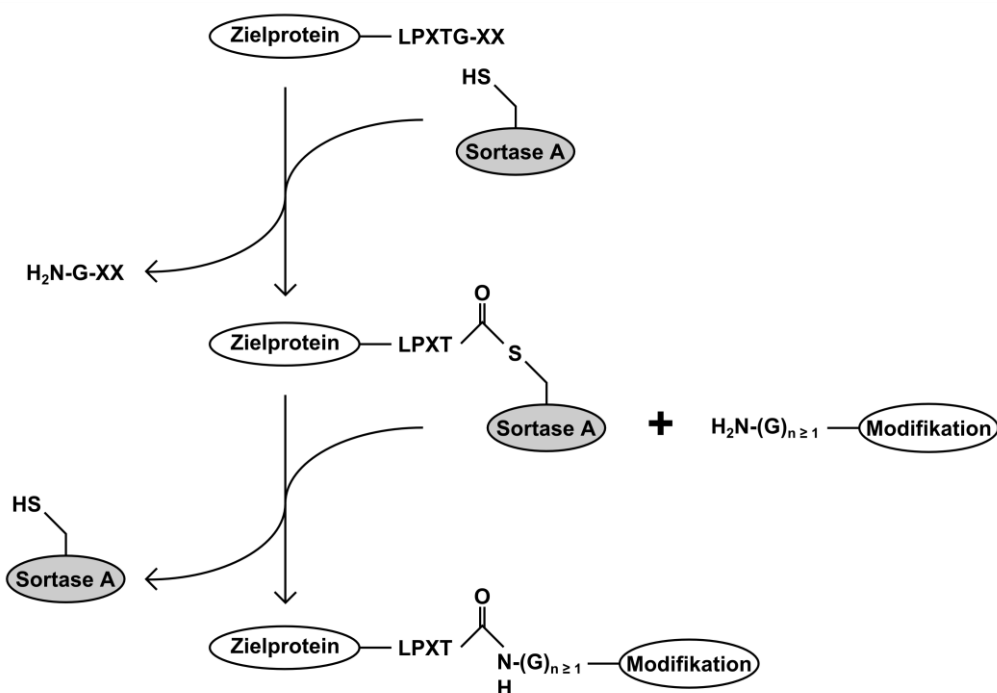
**Abb. 53:** Schematische Darstellung der C4BP-Calmodulin Fusionsproteine. CaM: Calmodulin, TEV-site: TEV-Protease Erkennungsstelle (ENLYFQ-S), tolerierte Positionen: grün, keine Expression: rot.

Hierdurch sollte der Weg für eine posttranslationale Funktionalisierung mit CaM-Bindepeptid-Fusionsproteinen geebnet werden. Am N-Terminus von Trx bzw. zwischen TEV-Protease-Erkennungssequenz und C4BP wurde der Einbau toleriert. Für die CaM-Fusion am C-Terminus des C4BP konnte jedoch keine lösliche Produktion nachgewiesen werden.<sup>172</sup> Für die beiden anderen Versionen (CaM-Trx-C4BP bzw. Trx-CaM-C4BP) konnte allerdings in anschließenden Tests die Bindung an ein synthetisch hergestelltes CaM-Bindepeptid detektiert werden.

Als weitere Möglichkeit zur *in vitro* Funktionalisierung wurde eine orthogonale Modifikation der N-Termini in Betracht gezogen. Nach Abspaltung des Trx-Fusionsproteins mittels TEV-Protease verbleibt am N-Terminus ein Serin, welches oxidiert und für chemische Kopplungsreaktionen verwendet werden kann. Prinzipiell konnte gezeigt werden, dass eine Funktionalisierung der Oligomerisierungsdomäne bspw. mit FTSC möglich ist. In darauffolgenden Experimenten mit Azid bzw. Alkin tragenden Linker-Molekülen konnte jedoch keine praktikable Strategie entwickelt werden. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Carolin Mai die Methode des Protein-Spleißens evaluiert. Hierbei handelt es sich um eine sehr elegante Methode zur *in vitro* aber auch *in vivo* Modifikation von Proteinen. Anhand der beiden Modellproteine Int<sup>C</sup>-Trx und tGFP-Ex<sup>N</sup>Int<sup>N</sup> konnte prinzipiell eine Spleiß-Reaktion nachgewiesen werden, allerdings nur mit einer Umsatzrate von ca. 50%. Aus diesem Grund wurde diese Methode für eine Funktionalisierung des C4BP verworfen, da es mit dieser Methode zum damaligen Zeitpunkt schwierig gewesen wäre, eine homogene Funktionalisierung des Heptamers zu erreichen. Seit etwa einem Jahr konnten durch rationales Design die Effizienz und Geschwindigkeit von DnaE *split*-Inteinen signifikant verbessert werden.<sup>195</sup> Die Entwicklungen auf diesem Gebiet sollten

daher weiter beobachtet werden und ggf. erneut für die Funktionalisierung multivalenter Grundgerüste in Betracht gezogen werden.

Eine Alternative zur *in vitro* Modifikation mittels Protein-Spleißen bietet bspw. das aus *S. aureus* stammende Enzym Sortase A. Dieses Enzym arbeitet unter milden Konditionen, ist hochspezifisch und erreicht nach Optimierung der Reaktionsbedingungen annähernd vollständige Umsatzraten.<sup>207</sup> Für die Reaktion wird am C-Terminus des Zielproteins eine fünf Aminosäuren lange Erkennungssequenz benötigt (LPXTG). Die Reaktion verläuft über die Ausbildung eines Thioacyl-Intermediates zwischen einem Cysteinrest der Sortase und der Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin der Erkennungssequenz (Abb. 54). Aminosäuresequenzen die sich C-terminal des Threonins befinden werden durch diese Reaktion abgetrennt. Das Intermediat wird durch den nukleophilen Angriff eines funktionalisierten Polyglycins aufgelöst. Als Produkt dieser Reaktion erhält man ein C-terminal modifiziertes Zielprotein.



**Abb. 54:** Mechanismus der Sortase-vermittelten Transpeptidase-Reaktion. Über die Ausbildung eines Thioacyl-Intermediates erfolgt eine kovalente Modifikation am C-Terminus des Zielproteins. LPXTG: Sortase-Erkennungssequenz,  $\text{H}_2\text{N-G-XX}$ : abgespaltener C-Terminus, XX: bspw. Affinitätsanhangsel um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen,  $\text{H}_2\text{N-(G)}_{n \geq 1}$ : Polyglycin am N-Terminus der Modifikation. (Modifiziert nach Popp *et al.* 2009<sup>207</sup>)

Die Anwendungsmöglichkeiten für diese Methode sind sehr vielseitig, bspw. Installation von diversen Fluorophoren,<sup>208</sup> L- und D-Peptiden, verzweigten Peptiden oder kompletten Proteinen wie GFP.<sup>209</sup> Mittlerweile konnte mit einer Kombination aus Oberflächendisplay und FACS-

Analyse die Aktivität der Wildtyp-Sortase um den Faktor 140 gesteigert werden.<sup>210</sup> Für die Erzeugung eines vollständig funktionalisierten C4BP-Heptamers stellt die Verwendung einer derart verbesserten Sortase eine vielversprechende Möglichkeit dar. Nach Beendigung der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung des Enzyms Sortase A in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Praktikabilität dieser Methode in Bezug auf eine ortsgerichtete Funktionalisierung von C4BP-Varianten sollte daher in Erwägung gezogen werden.

In Denaturierungs- und Renaturierungsexperimenten konnte die Rückfaltung von C4BP und Trx-C4BP beobachtet werden. Aufgrund dieser Rückfaltungseigenschaften der Oligomerisierungsdomäne könnte ebenfalls eine vollständige Funktionalisierung erreicht werden. Nach einer entsprechenden Modifikation müsste das Oligomer denaturiert werden und die funktionalisierten Monomere von nicht funktionalisierten getrennt werden. Eine Separation könnte hierbei mittels SEC oder Affinitätschromatographie erfolgen. Anschließend könnten homogene Heptamere aus den gereinigten Monomeren assembliert werden.

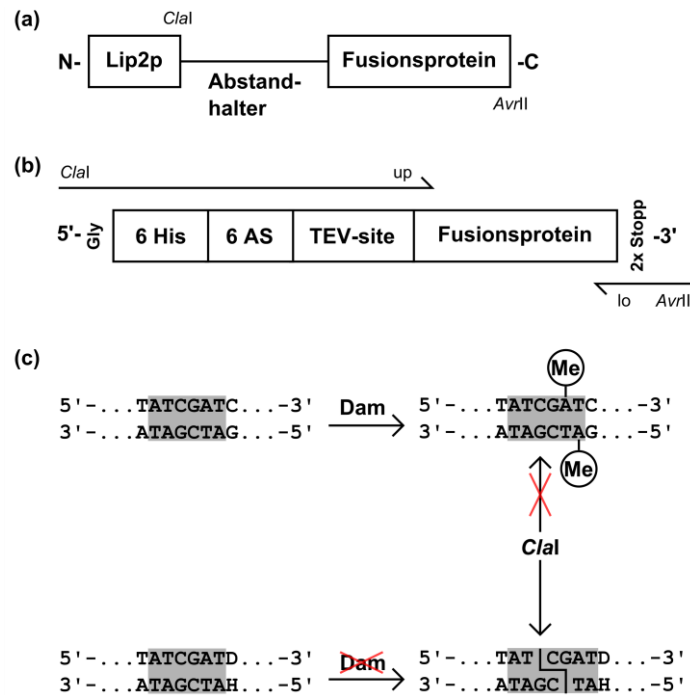
### 4.3 *Yarrowia lipolytica*

In diesem Kapitel wird ein *Yarrowia lipolytica*-Expressionssystem als mögliche Quelle interessanter Fusionspartner vorgestellt, die *in vitro* bspw. mittels Protein-Spleißen oder mit Sortase A an die Oligomerisierungsdomäne angefügt werden könnten. Zunächst werden die Klonierung und eine erste analytische Produktion beschrieben (4.3.1 und 4.3.2). Im Anschluss wird die Reinigungsstrategie vorgestellt (4.3.3), bevor abschließend die Evaluation der produzierten Proteine in individuellen Assays durchgeführt wird (4.3.4).

#### 4.3.1 Klonierung und genomische Integration

Um das *Yarrowia lipolytica* Expressionssystem zu charakterisieren, wurden drei in Größe, Komplexität und Funktion sehr unterschiedliche Proteine ausgewählt: Goase M1, Tryp-VHH und MCoTI. Da die Lipase Lip2p eines der am stärksten sekretierten endogenen Proteine von *Y. lipolytica* ist, wurden die Proteine als C-terminale Fusion an diese Lipase angefügt. Die codierenden Sequenzen der Fusionsproteine wurden in das Genom von *Y. lipolytica* Po1f Stämmen integriert. Zum einen sollte überprüft werden, ob die Integration unterschiedlicher Lip2p-Fusionen sich auf das Wachstum der Hefezellen auswirkt. Zum anderen wurde untersucht ob über den Nachweis der Lipase-Aktivität im Kulturmedium, Rückschlüsse auf die Akkumulation von Lip2p-Fusionsprotein gezogen werden können. Dies wäre hilfreich für die Planung einer Fermentation bspw. für die Festlegung des Erntezeitpunktes. Darüber hinaus wurde eine zielführende und allgemein anwendbare Reinigungsstrategie entwickelt.

Für die Klonierung der Lip2p-Fusionsproteine wurde der Vektor pGEM T Lip2p bereitgestellt (2.2). Die Klonierung der drei Fusionsproteine wurde mit diesem Plasmid in Darmstadt begonnen. Im Anschluss wurden die Lip2p-Fusionsgene in den Laboren des CSIR (*Council for Scientific and Industrial Research*, Pretoria, Südafrika) in Zusammenarbeit mit Siyavuya I. Bulani in das Integrationsplasmid pKOV410 überführt. Zunächst wurden die Gene der Zielproteine MCoTI, Tryp-VHH und Goase M1 unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide (Tabelle 3) aus den Plasmiden: pET16b\_Goase\_M1, pCT\_MCoTI-LKA\_R4K252 und pET32a Tryp-VHH amplifiziert (Abb. 55). Bei diesem Schritt wurden über die relativ langen up-Oligos an die 5'-Enden der Gene eine *Cla*I-Restriktionsschnittstelle, Hexahistidin-Epitop, 6 AS Abstandhalter und TEV-Protease-Erkennungsstelle angefügt.



**Abb. 55:** Aufbau der Fusionsproteine **(a)** Schematische Darstellung der Anordnung von Lip2p, Abstandhalter und Fusionsprotein, N-Terminus links, C-Terminus rechts **(b)** PCR-Modifikation der 5'- bzw. 3'-Enden der Gene der Fusionsproteine. Das up-Oligo codiert für den Abstandhalter zwischen Lip2p und Fusionsprotein: *Clal* Erkennungsstelle, Glycin, Hexahistidin-Epitop, sechs AS Abstandhalter und TEV-Protease-Erkennungsstelle. Das lo-Oligo codiert für zwei Stoppcodone und die *AvrII* Erkennungsstelle. **(c)** Schematische Darstellung der methylierungssensitiven *Clal* Umgebung. Die Sequenz der *Clal*-Erkennungsstelle ist grau hinterlegt. Dam: DNA Adenin Methyltransferase, Me: Methylgruppe, D: nicht C (A, G oder T), H: nicht G (A, C oder T). (Bildabschnitt (c) wurde modifiziert nach: rebase.neb.com)

Abhängig von der Beschaffenheit der angrenzenden Nukleotide ist die *Clal* Erkennungsstelle methylierungssensitiv (GATC). Um eine Dam-Methylierung zu vermeiden, wurde zwischen die Restriktionsschnittstelle und der für das Hexahistidin-Epitop codierenden DNA-Sequenz ein für Glycin codierendes Codon (GGA) definiert (Abb. 55). Über das lo-Oligo wurden an die 3'-Enden zwei Stoppcodone (TAA und TAG) gefolgt von einer *AvrII*-Erkennungsstelle angefügt. Das Plasmid pGEM T Lip2p (2.2) und die drei PCR-Produkte wurden mit den Enzymen *Clal* und *AvrII* gespalten (3.4.3) und mit T4-DNA-Ligase verknüpft (3.4.6). Die Ligationsansätze wurden gefällt (3.4.2) und zur Transformation elektrokompenter *E. coli* Top10 Zellen verwendet (3.1.5). Mit spezifischen Oligonukleotiden wurden mittels Kolonie-PCR positive Einzelklone identifiziert (3.4.8). Die Plasmide wurden präpariert (3.4.1) und die Sequenz der Konstrukte pGEM-YLip2p-Goase M1, pGEM-YLip2p-MCoTI und pGEM-YLip2p-Tryp-VHH mittels Sequenzierung verifiziert.

Die weitere Klonierung sowie eine erste Charakterisierung der Proteinsekretion wurde in Zusammenarbeit mit Siyavuya I. Bulani in den Laboren des CSIR (Pretoria, Südafrika) durchgeführt. Hier wurden die Lip2p-Fusionsgene aus den pGEM-Plasmiden mit den Enzymen

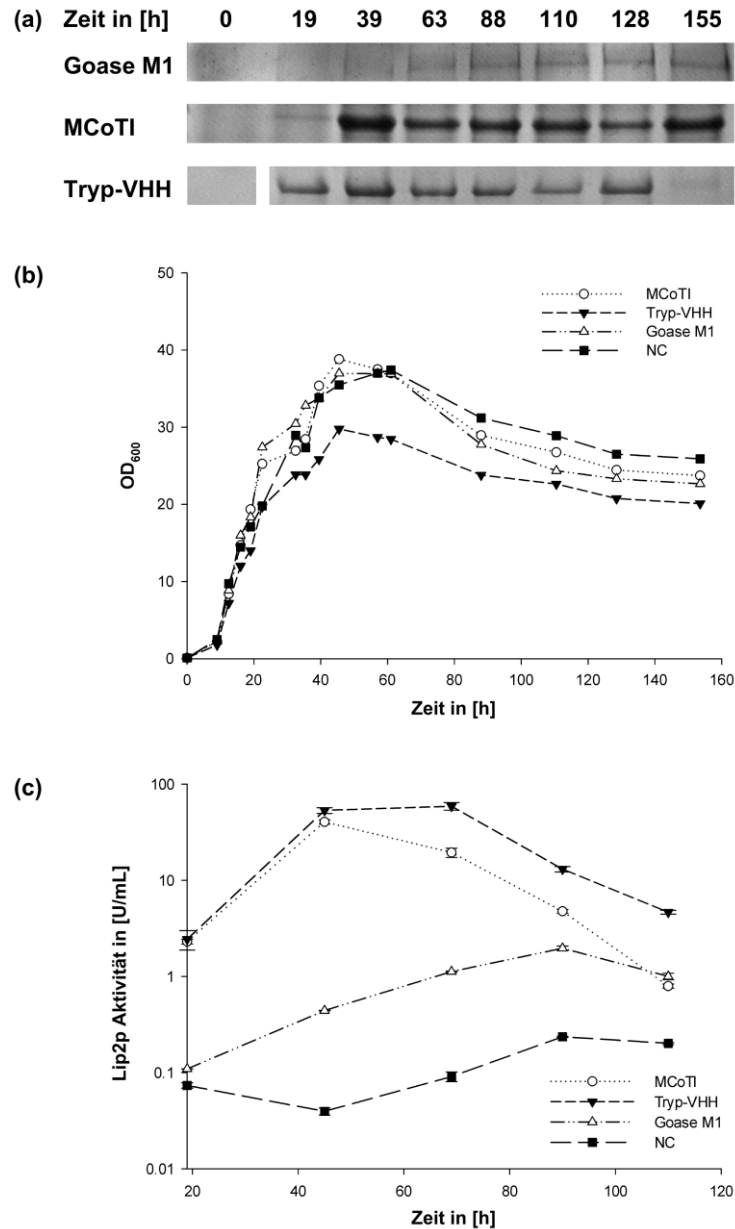
*HindIII* und *AvrII* gespalten (3.4.3) und in das gleichermaßen vorbereitete Plasmid pKOV410 ligiert (3.4.6). Das Integrationsplasmid pKOV410<sup>211</sup> wurde an der *University of the Free State* (Bloemfontein, Südafrika) hergestellt und mit einem MTA an den Kooperationspartner (CSIR, Pretoria, Südafrika) übergeben. Die Ligationsansätze wurden gefällt (3.4.2) und zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL10-Gold Zellen eingesetzt (3.1.7). Mit spezifischen Oligonukleotiden wurden mittels Kolonie-PCR positive Einzelklone identifiziert (3.4.8). Die Plasmide wurden präpariert (3.4.1) und die Integrität der Sequenzen mittels Sequenzierung verifiziert.

Die Plasmide pKOV410-YLip2p-Goase M1, pKOV410-YLip2p-MCoTI und pKOV410-YLip2p-Tryp-VHH wurden mit *NotI* linearisiert und für die Transformation von *Yarrowia lipolytica* Po1f eingesetzt (3.1.10).<sup>212</sup> Die Po1f Transformanten wurden auf YNB-casamino Selektivplatten ausgestrichen und bei 28 °C inkubiert. Nach ein bis drei Tagen wurden erste Kolonien auf den Platten erkennbar und konnten auf die Integration der Fusionsgene untersucht werden. Hierzu wurde die genomische DNA von Einzelklonen präpariert<sup>213</sup> und mittels der Primer pKOV410-F und pKOV410-R (Tabelle 3) analysiert. Positive *Y. lipolytica* Einzelklone konnten für alle Konstrukte identifiziert werden, diese wurden fortlaufend nummeriert und dem Fusionsprotein entsprechend als YLip2p-Goase M1, YLip2p-MCoTI bzw. YLip2p-Tryp-VHH benannt.

#### 4.3.2 Expression im analytischen Maßstab

Für eine erste Charakterisierung von Wachstum und Proteinsekretion wurden von jedem Konstrukt mehrere Einzelklone für die Inokulation von jeweils 50 mL YPD Medium ausgewählt. Mit Übernachtskulturen der Konstrukte YLip2p-Goase M1, YLip2p-MCoTI, YLip2p-Tryp-VHH sowie der untransformierten Negativkontrolle *Y. lipolytica* Po1f wurden Kolben auf eine  $OD_{600} = 0,1$  eingestellt und bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Über einen Zeitraum von sechs Tagen wurden Proben gezogen, um mittels Photometer die Zelldichte sowie mittels Aceton-Präzipitation die Akkumulation von sekretiertem Protein zu untersuchen. Des Weiteren wurde mit diesen Proben die Lipase-Aktivität der sekretierten Proteine verfolgt, um zu überprüfen, ob diese ggf. mit den Ausbeuten der Zielproteine korreliert (3.2.18). Die Daten sind der folgenden Abbildung zusammengestellt (Abb. 56).





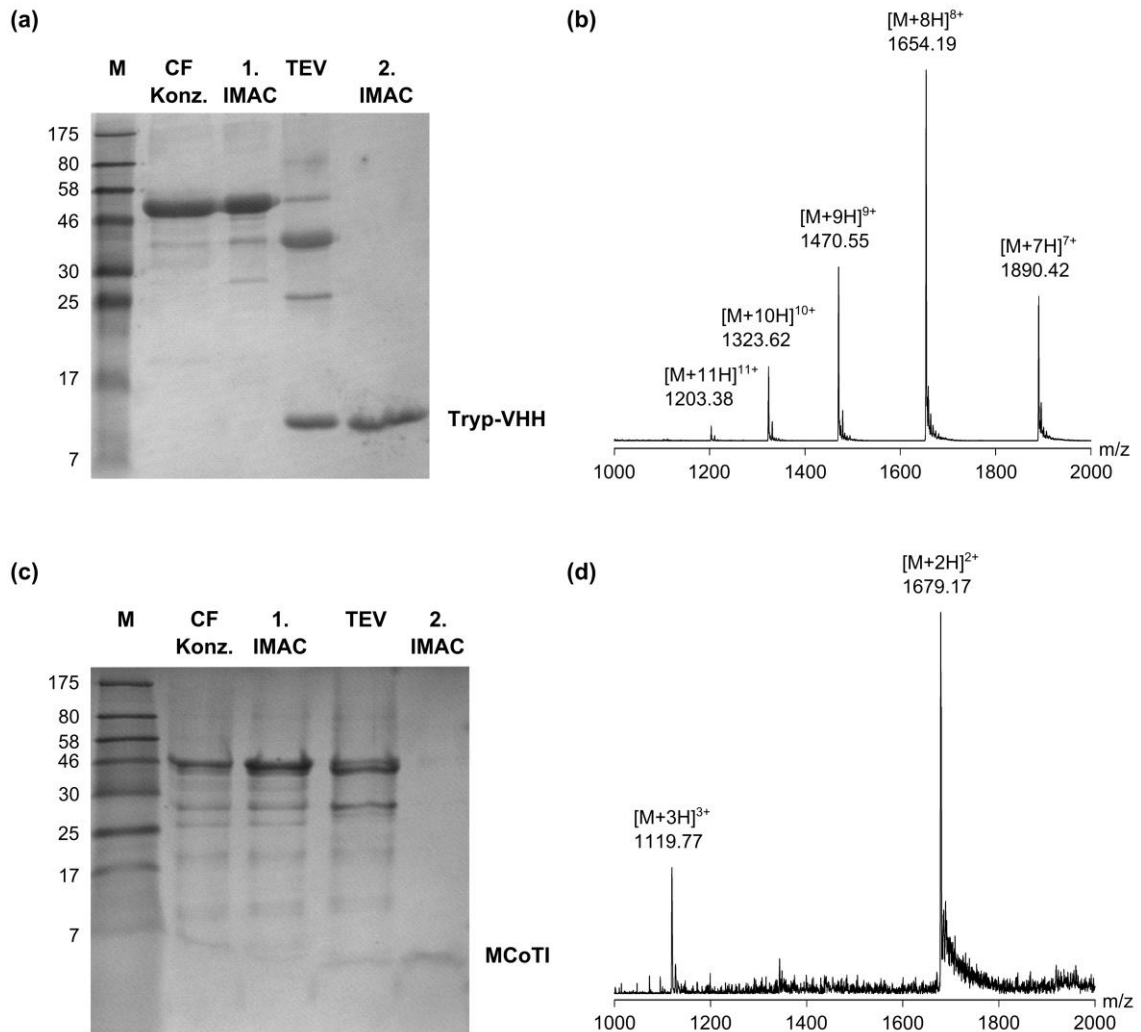
**Abb. 56:** Wachstum und Proteinsekretion der transformierten *Y. lipolytica* Zellen in 50 mL Schüttelkolben (a) SDS-PAGE Analyse der Proteinkonzentration im Überstand, aufgetragen wurden die Aceton-Präzipitationen von Proben der angegebenen Zeitpunkte (10-fach konzentriert). (b) Wachstumskurven der transformierten *Y. lipolytica* Kulturen. Untransformierte *Y. lipolytica* Pof1 wurden als Negativkontrolle eingesetzt. (c) Bestimmung der Lipase-Aktivität mit dem chromogenen Substrat *p*-NPP, Dreifachbestimmung, NC siehe (b). (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013b<sup>109</sup>)

Die Erkenntnisse aus diesen Vorversuchen wurden für die Durchführung der 1 L Produktionen verwendet.

### 4.3.3 Expression im präparativen Maßstab

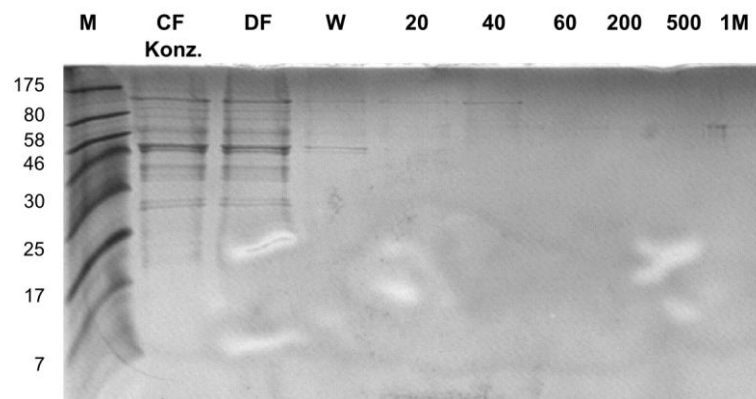
Analog zur Expression im analytischen Maßstab wurde das Produktionsvolumen auf 1 L erhöht. Nach 2 Tagen bei 28 °C und 180 rpm wurden die Zellen durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 6660 rpm von den Überständen getrennt. Im Anschluss wurden das Probenvolumen von 1 L steril filtriert (Stericap PLUS, 0,2 µm, Merck Millipore) und mit Hilfe eines Cross-Flow-Filters (Vivaflow 200 MWCO 30.000 Da, Sartorius) und einer präparativen Pumpe (K-1800, Knauer) auf ein Volumen von etwa 150 mL eingengt. Um die Proben für eine erste chromatographische Reinigung vorzubereiten, erfolgte im Zuge dieser Filtration gleichzeitig ein Austausch der wässrigen Phase weg vom Medium hin zu IMAC-A Puffer (20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,4). Die Fusionsproteine wurden über ihre 6His-Epitope mittels zwei in Reihe montierter 1 mL HisTrap-Säulen (GE Healthcare) an einem Äkta FPLC-System (GE Healthcare) aus dem Konzentrat gebunden. Durch einen steigenden Stufengradienten von Imidazol (20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM und 1 M Imidazol) erfolgte die Trennung der Zielproteine von unspezifisch gebundenen Proteinen sowie von Resten des verwendeten YPD-Mediums. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, über Nacht gegen 5 L IMAC-A Puffer dialysiert und am Folgetag auf ein Volumen von ca. 1 mL konzentriert (Amicon Ultra 3.000 MWCO Merck Millipore).

Im Falle des Fusionsproteins Lip2p-Goase M1 wurde die Reinigung an dieser Stelle beendet. Zum einen aufgrund geringer Interaktion mit der Säulenmatrix und daraus resultierendem hohen Verlust an Ausbeute, zum anderen war eine weitere Reinigung zum Nachweis der Bioaktivität nicht erforderlich. Die Fusionsproteine Lip2p-Tryp-VHH und Lip2p-MCoTI wurden mit TEV-Protease versetzt und über Nacht bei RT inkubiert (3.2.12). Die Effizienz der Spaltung wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert, siehe Abb. 57. In einer zweiten IMAC wurden aus dem Spaltungsansatz TEV-Protease, Lip2p und ungespaltenes Fusionsprotein entfernt. Die Proteine Tryp-VHH und MCoTI zeigten keine Interaktion mit der Säulenmatrix und eluierten im Durchfluss.



**Abb. 57:** Zusammenfassung des kompletten Reinigungsprozesses von **(a)** Tryp-VHH und **(c)** MCoTI jeweils auf einer SDS-PAGE aufgetragen, sowie ESI-MS-Messungen der gereinigten Zielproteine **(b und d)**. Die im Überstand enthaltenen Lip2p-Fusionsproteine wurden mittels Cross-Flow-Filtration konzentriert und umgepuffert bevor sie der ersten säulenchromatographischen Reinigung unterzogen wurden. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und mit TEV-Protease gespalten. Die abschließende Trennung der nun 6His-Epitop freien Zielproteine erfolgte in einer zweiten Affinitätschromatographie. Die Massen der Zielproteine (Tryp-VHH: berechnete Masse: 13227,06 Da, gemessen: 13225,52 Da, sowie die Masse des gereinigten MCoTI: berechnet: 3357,02 Da, gemessen: 3356,58 Da) wurden mit ESI-MS verifiziert. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013b<sup>109</sup>)

Das Molekulargewicht der beiden Zielproteine Tryp-VHH und MCoTI konnte mittels ESI-MS verifiziert werden. Im Falle des Fusionsproteins Lip2p-Goase M1 wurde der Reinigungsprozess nach IMAC I gestoppt, siehe Abb. 58. Aufgrund der Größe des Fusionsproteins (108,97 kDa) war eine LC-MS-Messung nicht möglich.



**Abb. 58:** SDS-PAGE Analyse mit IMAC-Fractionen der Lip2p-Goase M1 Reinigung. M: Marker, CF Konz.: Cross-Flow Konzentrat, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, Konzentration des Imidazolgradienten in mM und 1 M. MW Lip2p-Goase M1: 108,97 kDa.

Der Gesamtproteingehalt wurde bei jedem Reinigungsschritt mit verschiedenen Methoden bestimmt und ist in Tabelle 20 zusammengefasst. Die Funktionalität der gereinigten Proteine wurde in individuellen Assays verifiziert, siehe Abschnitte 4.3.4.

**Tabelle 20:** In dieser Tabelle sind die Proteinkonzentrationen zu jedem Zeitpunkt der Produktion dokumentiert. Als Negativkontrolle diente eine Kultur untransformierter *Y. lipolytica* Po1f Zellen. Kulturvolumen: 1 L, alle Angaben in mg. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013b<sup>109</sup>)

	Tryp-VHH	MCoTI	Goase M1	Po1f
Überstand	2300 <sup>a, c</sup>	2100 <sup>a, c</sup>	2500 <sup>a, c</sup>	2500 <sup>a, c</sup>
Cross-Flow Filtration	367 <sup>a, c</sup>	291 <sup>a, c</sup>	166 <sup>a, c</sup>	37 <sup>a, c</sup>
IMAC I	174 <sup>b, d</sup>	47 <sup>b, d</sup>	11 <sup>b, d, e</sup>	-
TEV Spaltung & IMAC II	30 <sup>b</sup>	3,3 <sup>b</sup>	-	-

<sup>a</sup> BCA Assay  
<sup>b</sup> Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration  
<sup>c</sup> Gesamtprotein  
<sup>d</sup> Fusionsprotein  
<sup>e</sup> hohe Verluste bei diesem Reinigungsschritt

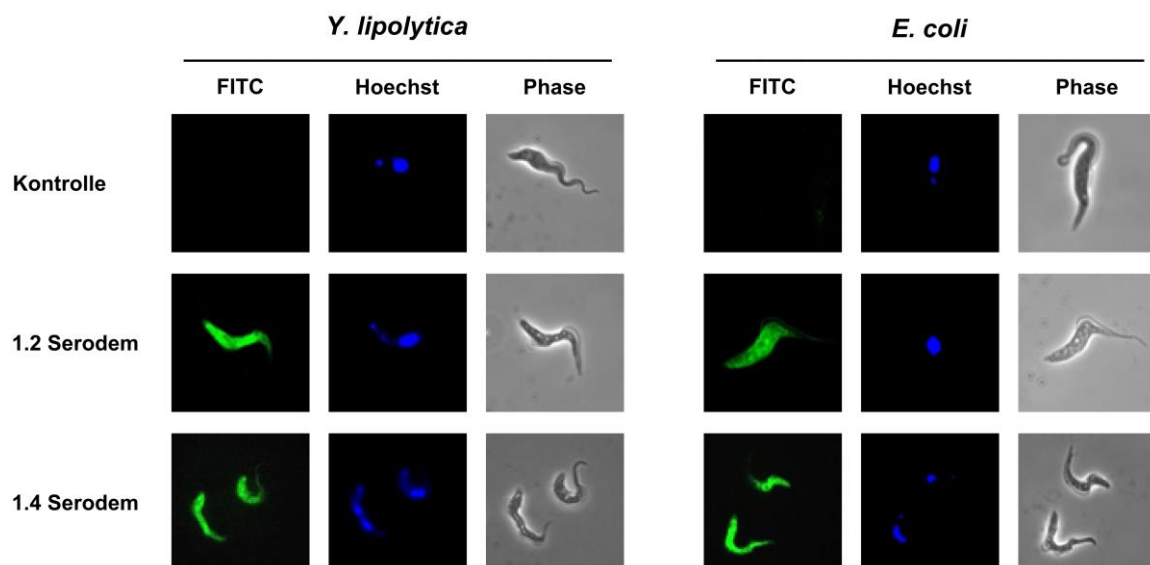
Die gereinigten Proteine wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 4.3.4 Überprüfung der Bioaktivität

Nach Etablierung einer Reinigungsstrategie und Bestimmung der Ausbeuten an Fusionsprotein, wurde die Aktivität der Proteine Tryp-VHH, MCoTI und Lip2p-Goase M1 untersucht. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften wurden drei individuelle Experimente durchgeführt.

##### 4.3.4.1 Tryp-VHH

Die Faltung des in *Y. lipolytica* produzierten Tryp-VHH wurde in einem Bindungstest mit lebenden *Trypanosoma brucei* Zellen untersucht (3.1.11). Die Kultivierung der Trypanosomen sowie die fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten wurden von Michael Brecht in den Laboren von Prof. Dr. H. U. Göringer (TU Darmstadt) durchgeführt. Eine frühere Präparation von Tryp-VHH aus *E. coli* diente bei diesem Test als Referenzprobe. Beide Proteine wurden am N-terminalen Serin mit Fluorescein-5-Thiosemicarbazide von Christina Uth modifiziert (3.2.13) und von Michael Brecht mit zwei unterschiedlichen *T. brucei* Blutstromformen (MITat 1.2 Serodem und MITat 1.4 Serodem) inkubiert (Abb. 59).



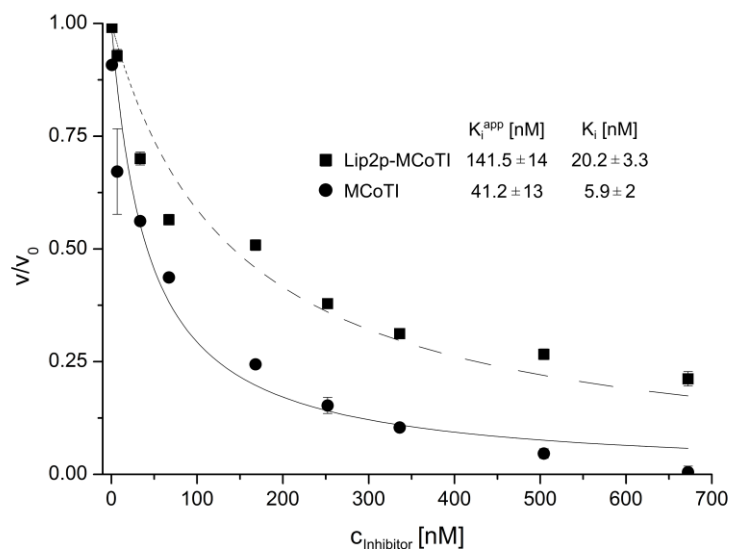
**Abb. 59:** *In vitro* Nachweis der Bindung von rekombinant hergestelltem Tryp-VHH an lebenden afrikanischen Trypanosomen. Der Tryp-VHH aus *Y. lipolytica* (links) bzw. eine aus *E. coli* stammende und bereits verifizierte Präparation (rechts) wurden, mit Fluorescein-5-Thiosemicarbazide markiert und zusammen mit zwei VSG-präsentierenden Blutstromformen (1.2 Serodem - VSG 221; 1.4 Serodem - VSG 117) inkubiert. Als Kontrolle wurden Trypanosomen-Zellen eines Insektenstadiums ohne VSG-Präsentation verwendet. Hoechst: DNA-Färbung mit Hoechst 33342, FITC: Fluoreszenzkanal, Phase: Phasenkontrastmikroskop. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013b<sup>109</sup>)

Die aufgenommenen Bilder zeigen, dass beide Antikörperfragmente die VSG-Oberfläche der Trypanosomen erkennen und markieren können. Die Negativkontrolle (*T. brucei*

Insektenstadium ohne VSG-Präsentation) wurde hingegen nicht gebunden. Das Paratop des Tryp-VHH scheint in funktionell gefalteter Form und zugänglich vorzuliegen.

#### 4.3.4.2 Miniprotein

Aus den LCMS-Daten (Abb. 57 d) konnte lediglich geschlossen werden, dass die Thiolgruppen der sechs Cysteinreste des Miniproteins oxidiert wurden und in Form von Disulfidbrücken vorlagen. Für die Aktivität des Miniproteins ist allerdings die Ausbildung eines speziellen Disulfidbrückenmusters zwingend. Die biologische Aktivität des Miniproteins wurde in einem Protease-Inhibitionstest von Bernhard Glotzbach untersucht (3.2.19), (Abb. 60). Zur Inhibition von Trypsin wurden sowohl das fertig gereinigte MCoTI wie auch das ungespaltene Fusionsprotein Lip2p-MCoTI eingesetzt.

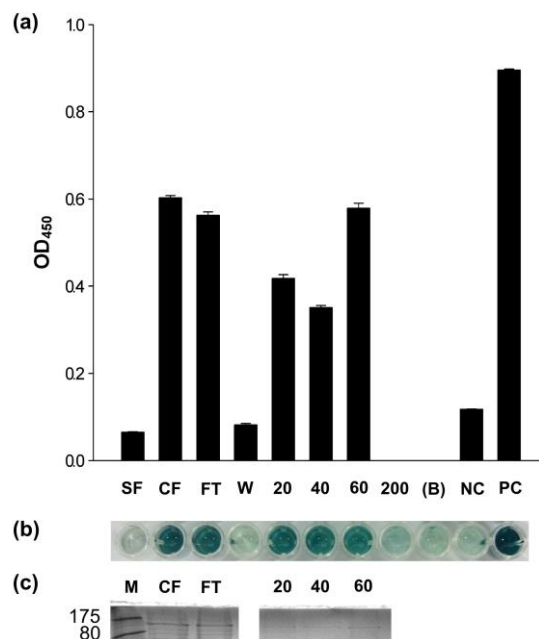


**Abb. 60:** Trypsin-Inhibitionskurven für Lip2p-MCoTI (Vierecke) und MCoTI (Kreise) wurden durch Fitting der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten mit der Morrison-Gleichung erhalten.<sup>164</sup> Die  $K_i$ -Werte wurden aus den erhaltenen  $K_i^{app}$ , die durch Fitting der Umsatzgeschwindigkeiten des Substrates ermittelt wurden, und der  $K_m$  des Enzyms für das Substrat, die zuvor bestimmt wurden, ermittelt.<sup>214</sup> Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013b<sup>109</sup>)

Der Anteil an aktivem Inhibitor wurde mittels Titration von MCoTI und Trypsin bestimmt und lag bei annähernd 100%. Beide Proteine zeigten in dem durchgeführten Inhibitionstest eine konzentrationsabhängige Inhibition der Protease. Der solitäre Cystin-Knoten mit einer Inhibitionskonstante von 5,9 nM war hierbei etwa vierfach effektiver als das Lip2p-MCoTI Fusionsprotein mit einer  $K_i$  von 20,2 nM.

#### 4.3.4.3 Goase M1

Das Lip2p-Goase M1 Fusionsprotein war mit 108,97 kDa das mit Abstand größte Fusionsprotein das zur Evaluation des *Yarrowia lipolytica*-Expressionssystems produziert wurde. Nach der ersten chromatographischen Reinigung mittels IMAC (Abb. 58) und den damit verbundenen hohen Verlusten wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet. Die IMAC-Fractionen wurden mittels ABTS-Test (3.2.20) auf Goase-Aktivität untersucht, siehe Abb. 61.



**Abb. 61:** ABTS-Test mit verschiedenen Fraktionen der Lip2p-Goase M1 Reinigung nach IMAC und Dialyse gegen PBS. **(a)** Der Substratumsatz der verschiedenen Fraktionen wurde im ELISA bei 450 nm untersucht. **(b)** Fotografie der ELISA Messung zur Veranschaulichung der Enzymaktivität in den unterschiedlichen Fraktionen. **(c)** SDS-PAGE mit ausgewählten Fraktionen des Lip2p-Goase M1 Fusionsproteins. SF: Sterilfiltrat, CF: Cross-Flow-Filtrat, DF: Durchfluss, W: Waschschrift, 20, 40, 60, 200: Imidazolkonzentrationen in mM, (B): Blank (PBS), NK: Negativkontrolle (vereinigte Fraktionen von Lip2p-MCoTI nach IMAC), PK: die Positivkontrolle enthielt alle Komponenten außer der Probe, diese wurde durch PBS mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ersetzt. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. (Modifiziert nach Hofmeyer *et al.* 2013b<sup>109</sup>)

Auf Grund der hohen Enzymaktivität im Durchfluss und der durchgeführten SDS-PAGE (Abb. 58 und Abb. 61) war davon auszugehen, dass das 6His-Epitop des Lip2p-Goase M1 Fusionsproteins nur schlecht mit der Ni-NTA Matrix interagiert. In den Fraktionen 20 mM, 40 mM und 60 mM konnte der gebundene Teil des Fusionsproteins von der Säulenmatrix eluiert werden. Bis auf die Fraktionen W und 200 mM wurde in allen Fraktionen Goase-Aktivität nachgewiesen. Die Goase scheint als Lip2p-Fusionsprotein korrekt gefaltet und in aktiver Form vorzuliegen.



#### 4.3.5 Diskussion

Die erste rekombinante Expression von Proteinen erfolgte 1973 mit der Plasmid-kodierten Übertragung von Antibiotikaresistenzen auf den Wirt *E. coli*.<sup>215</sup> Wenige Jahre später wurden die Peptidhormone Somatostatin und Insulin als erste chemisch synthetisierte Gene ebenfalls in *E. coli* exprimiert.<sup>216; 217</sup> Diesen Ereignissen folgte die Entwicklung und Etablierung unterschiedlichster Systeme für die heterologe Produktion rekombinanter Proteine. Je nach Problemstellung kann heutzutage eine Produktion in Bakterien, Hefen, Insekten- und Säugerzellen, Pflanzen oder *in vitro* mit zellfreien Expressionssystemen erfolgen. Die Vielzahl dieser Expressionssysteme unterstreicht einerseits ihre Relevanz für die moderne Forschung und verdeutlicht andererseits, dass kein universelles Expressionssystem existiert.<sup>218</sup> Alle Systeme haben ihre Stärken und Schwächen, Möglichkeiten und Limitierungen. Das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem in der unkonventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica* stellt eine robuste Erweiterung, wenn nicht sogar Alternative zu vielen der bereits etablierten Expressionssysteme dar.

Die Klonierung und genomische Integration der drei untersuchten Proteine wurde mittels PCR und Sequenzierung verifiziert. Im analytischen Maßstab konnte die Akkumulation der sekretierten Lip2p-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die Charakterisierung der Sekretion sowie die Optimierung der Reinigung wurden in Zusammenarbeit mit Julius Grzeschik und Simon Krah durchgeführt. Die Kombination der Daten aus Aceton-Präzipitation und Lip2p-Aktivitätstest lieferte Hinweise um eine optimale Fermentationsdauer abzuschätzen. Die genomische Integration der Fusionsproteine scheint hierbei keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zellen zu haben, die maximale Zelldichte konnte bei allen Kulturen inklusive negativ Kontrolle nach 48 h festgestellt werden. Bei den Fusionsproteinen Lip2p-MCoTI und Lip2p-Tryp-VHH war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls die maximale Lipase-Aktivität erreicht. Im Fall von Lip2p-Goase wurden erst nach etwa 96 h die maximale Lipase-Aktivität und die Zunahme an präzipitiertem Fusionsprotein detektiert. Wahrscheinlich führt die Größe des Lip2p-Goase-Fusionsproteins zu einer unvollständigen bzw. verlangsamten Sekretion. Die Akkumulation der Fusionsproteine im Überstand sowie die Lipase-Aktivität war bei allen drei Proteinen sehr unterschiedlich. Im Vergleich zu der untransformierten Negativkontrolle konnte allerdings bei allen Konstrukten ein signifikanter Anstieg der Lipase-Aktivität beobachtet werden, was diese Methode zu einem praktischen Werkzeug für die Abschätzung der Menge an sekretiertem Fusionsprotein macht.

Aufgrund der Geometrie der verwendeten Schüttelkolben konnten die Ergebnisse der 50 mL Kulturen über das Wachstum und die Proteinkonzentration im Überstand auf 1 L Kulturen

übertragen werden.<sup>219</sup> Die entwickelte Reinigungsstrategie bestehend aus Cross-Flow-Filtration, IMAC, TEV-Protease-Spaltung und IMAC erwies sich als zweckmäßig und ermöglichte die Reinigung der Zielproteine innerhalb von zwei Tagen. Lip2p-Goase hat im Gegensatz zu den beiden anderen Fusionsproteinen nur schwach mit der IMAC-Säulenmatrix interagiert, wodurch sehr viel Protein im Durchfluss detektiert wurde. Aus diesem Grund wurde die Reinigung von Lip2p-Goase nach der ersten IMAC gestoppt. Wahrscheinlich ist das 6His-Epitop, welches zwischen Lipase und Goase lokalisiert ist, aufgrund der Größe des Fusionsproteins nur schlecht zugänglich. Die Architektur der Linker-Sequenz wurde für diese Experimente allerdings bewusst so gewählt, dass nach der Spaltung mit TEV-Protease an den Zielproteinen keine Affinitätsanhängsel mehr verbleiben. Um die Ausbeuten zu steigern sollte für Reinigung großer Proteine (>70 kDa) ggf. in Erwägung gezogen werden das 6His-Epitop bspw. an den C-Terminus des Zielproteins zu verlagern. Eine elegante Alternative wäre darüber hinaus die Verwendung einer Lipase-Affinitätschromatographie. Durch die Immobilisierung eines kompetitiven Lipase-Inhibitors oder anti-Lip2p Antikörpers auf der Säulenmatrix könnten die Lip2p-Fusionsproteine ohne das Vorhandensein weiterer Affinitätsanhängsel vom Überstand getrennt werden.<sup>220</sup> Mit der hier verwendeten Reinigungsstrategie wurden die folgenden Ausbeuten für die gereinigten Proteine erzielt: 3,3 mg für MCoTI und 33 mg für Tryp-VHH bzw. 11 mg für das Lip2p-Goase-Fusionsprotein. Eine Steigerung der Ausbeuten unter Verwendung der hier beschriebenen Konstrukte sollte durch eine Optimierung der Fermentation möglich sein.<sup>105</sup> Für neue Experimente sollte eine Anpassung der heterologen DNA-Sequenzen an den *Y. lipolytica codon usage* in Erwägung gezogen werden.<sup>221; 222</sup> Des Weiteren kann die Häufigkeit von Integrationsereignissen über den Nachweis der Lipase-Aktivität mittels Tributyrin-Platten oder die Hydrolyse von pNPP als Substrat erfolgen.<sup>223</sup> Dennoch konnte mit dem hier verwendeten Expressionssystem im Fall des Tryp-VHH die Ausbeute im Vergleich zu einem in *P. pastoris* produzierten VHH um das 2 bis 3-fache und im Vergleich zu einer *E. coli* Präparation um das 6-fache gesteigert werden.<sup>224; 225</sup> Mit *S. cerevisiae* wurden allerdings auch schon deutlich höhere Ausbeuten erzielt, wobei die Menge an sekretiertem Protein sehr stark bei verschiedenen VHHs variiert.<sup>226</sup> Die Ausbeute an MCoTI ist mit früheren Präparationen aus *E. coli* und *P. pastoris* vergleichbar.<sup>227; 228</sup> In Bezug auf die Produktion von Goase ist das hier verwendete Expressionssystem nicht konkurrenzfähig.<sup>229</sup> Die geringen Ausbeuten könnten hierbei im *E. coli codon usage* des verwendeten Goase Gens bzw. im vergleichsweise hohen MW des Fusionsproteins begründet liegen. Wobei in der Literatur bereits die Produktion von Proteinen vergleichbarer Größe in *Y. lipolytica* beschrieben wurde.<sup>223</sup> Gegebenenfalls kann die Ausbeute unter Verwendung des bestehenden Konstrukts durch eine Optimierung der Fermentationsbedingungen bzw. eine effizientere Reinigungsstrategie gesteigert werden.<sup>105</sup>

Neben der quantitativen Beurteilung des *Y. lipolytica* Expressionssystems war ein zentraler Punkt dieses Experimentes die qualitative Untersuchung der produzierten Proteine. Die Bioaktivität und damit eine korrekte Tertiärstruktur der drei Proteine konnte hierbei in drei individuellen Assays bestätigt werden. Im Fall von MCoTI wurde die Bioaktivität mit einem Protease-Inhibitionstest überprüft. Als Mitglied der Cystein-Knoten Miniprotein Familie hängt die Bindung der Protease und spezifische Inhibition des aktiven Zentrums essentiell von der korrekten Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken des Miniproteins ab.<sup>163; 230</sup> In dem durchgeführten Test waren sowohl das Lip2p-MCoTI Fusionsprotein wie auch das solitäre MCoTI in der Lage, die proteolytische Aktivität von bovinem Trypsin zu inhibieren. MCoTI hatte hierbei eine Inhibitionskonstante von 5,9 nM was einer  $K_i$  von vergleichbaren chemisch synthetisierten Miniproteinen entspricht.<sup>231</sup> Interessanterweise liegt die Inhibitionskonstante des Lip2p-Fusionsproteins mit 20,2 nM etwa um das Vierfache höher im Vergleich zum solitären MCoTI. Sehr wahrscheinlich wird die Interaktion des Inhibitor-Loops im Lip2p-Miniprotein mit dem aktiven Zentrum der Protease durch sterische Hinderung erschwert. Basierend auf der Titration von aktivem Inhibitor mit Trypsin waren fast 100% des isolierten Fusionsproteins aktiv. Darüber hinaus konnte das rekombinant produzierte MCoTI mittels ESI-MS nachgewiesen werden (Berechnete Masse: 3357,02 Da und gemessene Masse: 3356,58 Da). Die Kombination der gesammelten Daten legt nahe, dass mit dem hier verwendeten *Y. lipolytica* Expressionssystem korrekt gefaltetes und somit aktives Miniprotein hergestellt wurde. Im Vergleich mit der chemischen Synthese von Miniproteinen, die nach zahlreichen Syntheseschritten und oxidativer Faltung moderate Ausbeuten zwischen 9,5-27,8% liefert, hat die heterologe Produktion in dem eukaryotischen *Y. lipolytica* Expressionssystem mehrere Vorteile.<sup>223; 231</sup> Tatsächlich ist sie vergleichsweise preisgünstig, weniger zeitaufwändig und gleichzeitig umweltschonender. Darüber hinaus wird der kritischste Schritt bei der chemischen Synthese, nämlich die oxidative Faltung der Cystein-Knoten welche essentiell für die Bioaktivität der Miniproteine ist und oft in signifikanten Mengen falschgefalteter Disulfidbrücken resultiert, durch die endogene Qualitätskontrolle bei der Expression in der eukaryotischen Hefe *Y. lipolytica* übernommen.

Die korrekte Faltung des Tryp-VHH wurde durch einen Bindungstest an lebenden afrikanischen Trypanosomen überprüft. Eine Tryp-VHH Produktion aus *E. coli* diente hierbei als Referenzprotein. Beide Tryp-VHH Präparationen wurden am N-Terminus mit Fluorescein-5-Thiosemicarbazid modifiziert und mit VSG-präsentierenden *T. brucei* Zellen inkubiert (MITat 1.2 Serodem und MITat 1.4 Serodem). Die aufgenommenen Daten zeigen, dass beide Proteine spezifisch an der Oberfläche der lebenden Parasiten binden. Hierbei scheinen die Antikörperfragmente nicht zwischen den beiden unterschiedlichen VSG-Varianten zu

---

unterscheiden, des Weiteren wurde keine Bindung an der VSG-freien Oberfläche eines *T. brucei* Insektenstadiums nachgewiesen. Dieses Experiment zeigen die funktionelle Faltung des in *Y. lipolytica* produzierten Antikörperfragmentes. Abschließend sollte festgehalten werden, dass die Ausbeute an rekombinant in *Y. lipolytica* produziertem Tryp-VHH verglichen mit der Produktion in *E. coli* sechsmal höher ausgefallen ist.

Das Enzym Galactose Oxidase Version M1 benötigt für seine biologische Aktivität  $\text{Cu}^{2+}$  im aktiven Zentrum. Die Aktivität des Lip2p-Goase M1 Fusionsproteins wurde in einem ABTS-Test untersucht. Hierbei wurde die Bildung von Wasserstoffperoxid bei der Oxidation von Galactose durch die Umsetzung von ABTS nachgewiesen (3.2.20). Dies bedeutet, dass auch Proteine mit relativ komplexer Tertiärstruktur durch eine Produktion als Lip2p-Fusionsprotein in *Yarrowia lipolytica* zugänglich sind.

---

## 5 Zusammenfassung & Ausblick

---

Im Zuge der vorliegenden Dissertation wurde die Kristallstruktur der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne der 7 $\alpha$ -Isoform des humanen C4BP aufgeklärt. Die Generierung der hierfür benötigten zahlreichen Varianten lieferte viele Informationen über Kristallisationsbedingungen, Stabilität, Toleranz hinsichtlich von Mutationen und Aminosäureaustauschen.

Die Kristallstruktur der 7 $\alpha$ -Isoform diente als Ausgangspunkt zur Erstellung von *in silico* Modellen der drei übrigen natürlich vorkommenden Isoformen von C4BP. Die hierbei vorgeschlagene Positionierung der  $\beta$ -Kette ist plausibel. Trotzdem bleiben Fragen hinsichtlich der Assemblierung, Tätigkeit von Chaperonen und *in vivo* Regulation unbeantwortet. Eine *in vitro* Assemblierung von Heterooligomeren aus rekombinant hergestellten Untereinheiten konnte nicht realisiert werden. Dennoch lieferten Experimente in dieser Richtung Erkenntnisse über die beeindruckende Rückfaltungsfähigkeit der Oligomerisierungsdomäne. Diese Ergebnisse könnten sich für zukünftige Experimente in Richtung der Diskriminierung und Separation funktionalisierter Monomere als nützlich erweisen.

Durch die sukzessive Verkürzung der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP wurde eine Minimalvariante erhalten, die nach wie vor zur Oligomerisierung in der Lage ist, jedoch anstelle von 66 nur noch aus 38 Aminosäuren besteht. Auf Kosten der Disulfidbrücken und damit der Gesamtstabilität scheint eine weitere Verkürzung vom N-Terminus her möglich. Da dieser Bereich für die Assemblierung eine untergeordnete Rolle spielt, ist eine maximal verkürzte Variante vorstellbar, die lediglich aus den Helices H2 besteht und in einer Art heptamere Coiled-Coil Struktur aufgebaut ist.

Unabhängig davon ermöglicht die aus 38 Aminosäuren bestehende Variante bereits die Synthese von monomeren Peptiden mittels Festphasensynthese. Mit dieser Technik können in Kombination mit der Kristallstruktur mehrfachfunktionalisierte Monomere synthetisiert werden. Darüber hinaus liegt hierdurch der Austausch aller Aminosäuren mit D- anstelle von L-Konfiguration im Bereich des Möglichen. Somit ist eine zusätzliche Steigerung der Gesamtstabilität und Verlängerung der *in vivo* Halbwertszeit denkbar.

Ein *Yarrowia lipolytica* Expressionssystem wurde im Hinblick auf die heterologe Produktion von C4BP-basierten Homo- und Heterooligomeren untersucht. Die in Größe, Komplexität und phylogenetischem Ursprung sehr unterschiedlichen Modellproteine konnten als Lip2p-Fusionen in guten Ausbeuten produziert und gereinigt werden. Eine Steigerung der erzielten Ausbeuten ist durch Optimierung des *codon usage*, der Fermentationsbedingungen sowie der

Reinigungsstrategie vorstellbar. Zur weiteren Evaluierung des Expressionssystems sollten zusätzliche VHHs und Miniproteine sowie Proteine deren Expression sich in *E. coli* als nicht zielführend erwiesen hat untersucht werden.

Schließlich bietet es sich ebenfalls an, in diesem Expressionssystem die Produktion von C4BP Fusionsproteinen zu untersuchen. Möglicherweise lassen sich mit diesem eukaryotischen Expressionssystem rekombinant funktionalisierte Oligomere realisieren, die in einer *E. coli* Expression unzugänglich waren.

Die Arbeiten an der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4BP werden weitergeführt von Christina Uth, Sebastian Hörner (chemische Kopplung) und Bernhard Valldorf (*scaffolding* im Kontext von *metabolic engineering*).

---

## 6 Literaturverzeichnis

---

1. Reichert, J. M. (2011). Next generation and biosimilar monoclonal antibodies: essential considerations towards regulatory acceptance in Europe. February 3-4, 2011, Freiburg, Germany. *MAbs* **3**, 223-40.
2. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D. & Tonini, G. (2008). The biological properties of cetuximab. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **68**, 93-106.
3. Adams, G. P. & Weiner, L. M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1147-57.
4. Janeway, C., Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. 8th edit, Garland Science, New York.
5. Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W. & McPherson, A. (1997). Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 1581-97.
6. Perkins, S. J., Nealis, A. S., Sutton, B. J. & Feinstein, A. (1991). Solution structure of human and mouse immunoglobulin M by synchrotron X-ray scattering and molecular graphics modelling. A possible mechanism for complement activation. *J. Mol. Biol.* **221**, 1345-66.
7. Actor, J. K. (2012). *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology*. 2nd edit, Elsevier Saunders, Philadelphia.
8. Daneschdar, M. (2010). Neue Wege zur rekombinanten Oligomerisierung von Peptiden und Proteinen über den mitochondrialen Tim10/Tim9-Komplex. *Doktorarbeit*, Technische Universität Darmstadt.
9. Deyev, S. M. & Lebedenko, E. N. (2008). Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design. *Bioessays* **30**, 904-18.
10. Skerra, A. (2008). Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* **275**, 2677-83.
11. Stumpp, M. T., Binz, H. K. & Amstutz, P. (2008). DARPin: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* **13**, 695-701.



- 
12. Thie, H., Binius, S., Schirrmann, T., Hust, M. & Dubel, S. (2009). Multimerization domains for antibody phage display and antibody production. *N. Biotechnol.* **26**, 314-21.
  13. Avrutina, O., Empting, M., Fabritz, S., Daneschdar, M., Frauendorf, H., Diederichsen, U. & Kolmar, H. (2009). Application of copper(I) catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition to the synthesis of template-assembled multivalent peptide conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4177-85.
  14. Fabritz, S., Horner, S., Avrutina, O. & Kolmar, H. (2013). Bioconjugation on cube-octameric silsesquioxanes. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 2224-36.
  15. Hermanson, G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*. 1st edit, Academic Press, San Diego, London.
  16. Hirakawa, H. & Nagamune, T. (2013). Use of *Sulfolobus solfataricus* PCNA subunit proteins to direct the assembly of multimeric enzyme complexes. *Methods Mol. Biol.* **978**, 149-63.
  17. Wang, L., Liu, X., Zhu, X., Wang, W., Liu, C., Cui, H., Sun, M. & Gao, B. (2013). Generation of single-domain antibody multimers with three different self-associating peptides. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 417-23.
  18. Zhang, J., Tanha, J., Hiramata, T., Khieu, N. H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J. R. & MacKenzie, C. R. (2004). Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J. Mol. Biol.* **335**, 49-56.
  19. Bordet, J. & Gengou, O. (1901). Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *Ann. Inst. Pasteur* **15**, 289-302.
  20. Bohana-Kashtan, O., Ziporen, L., Donin, N., Kraus, S. & Fishelson, Z. (2004). Cell signals transduced by complement. *Mol. Immunol.* **41**, 583-97.
  21. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785-97.
  22. de Córdoba, S. R., Tortajada, A., Harris, C. L. & Morgan, B. P. (2012). Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs. *Immunobiology* **217**, 1034-46.

- 
23. Wallis, R., Mitchell, D. A., Schmid, R., Schwaeble, W. J. & Keeble, A. H. (2010). Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* **215**, 1-11.
  24. Perry, A. J., Wijeyewickrema, L. C., Wilmann, P. G., Gunzburg, M. J., D'Andrea, L., Irving, J. A., Pang, S. S., Duncan, R. C., Wilce, J. A., Whisstock, J. C. & Pike, R. N. (2013). A molecular switch governs the interaction between the human complement protease C1s and its substrate, complement C4. *J. Biol. Chem.* **288**, 15821-9.
  25. Law, S. K. & Dodds, A. W. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* **6**, 263-74.
  26. Matsushita, M., Endo, Y. & Fujita, T. (2013). Structural and Functional Overview of the Lectin Complement Pathway: Its Molecular Basis and Physiological Implication. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **61**, 273-283.
  27. Sahu, A., Kozel, T. R. & Pangburn, M. K. (1994). Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem. J.* **302 (Pt 2)**, 429-36.
  28. Fearon, D. T. & Austen, K. F. (1975). Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J. Exp. Med.* **142**, 856-63.
  29. Spitzer, D., Mitchell, L. M., Atkinson, J. P. & Hourcade, D. E. (2007). Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J. Immunol.* **179**, 2600-8.
  30. Bexborn, F., Andersson, P. O., Chen, H., Nilsson, B. & Ekdahl, K. N. (2008). The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H<sub>2</sub>O)Bb). *Mol. Immunol.* **45**, 2370-9.
  31. Rawal, N. & Pangburn, M. (2001). Formation of high-affinity C5 convertases of the alternative pathway of complement. *J. Immunol.* **166**, 2635-42.
  32. Rawal, N., Rajagopalan, R. & Salvi, V. P. (2008). Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement. *J. Biol. Chem.* **283**, 7853-63.

- 
33. Müller-Eberhard, H. J. (1985). The killer molecule of complement. *J. Invest. Dermatol.* **85**, 47s-52s.
  34. Müller-Eberhard, H. J. (1986). The membrane attack complex of complement. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 503-28.
  35. Nagata, S. & Glovsky, M. M. (1987). Activation of human serum complement with allergens. I. Generation of C3a, C4a, and C5a and induction of human neutrophil aggregation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **80**, 24-32.
  36. Amara, U., Flierl, M. A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Bruckner, U. B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J. D. & Huber-Lang, M. (2010). Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J. Immunol.* **185**, 5628-36.
  37. Dahlbäck, B., Smith, C. A. & Müller-Eberhard, H. J. (1983). Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 3461-5.
  38. Ricklin, D. & Lambris, J. D. (2013). Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J. Immunol.* **190**, 3831-8.
  39. Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881-90.
  40. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metoz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-8.
  41. Hofmeyer, T., Schmelz, S., Degiacomi, M. T., Dal Peraro, M., Daneschdar, M., Scrima, A., van den Heuvel, J., Heinz, D. W. & Kolmar, H. (2013a). Arranged Sevenfold: Structural Insights into the C-Terminal Oligomerization Domain of Human C4b-Binding Protein. *J. Mol. Biol.* **425**, 1302-17.
  42. Kask, L., Hillarp, A., Ramesh, B., Dahlbäck, B. & Blom, A. M. (2002). Structural requirements for the intracellular subunit polymerization of the complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 9349-57.
  43. Blom, A. M., Webb, J., Villoutreix, B. O. & Dahlbäck, B. (1999). A cluster of positively charged amino acids in the C4BP alpha-chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function. *J. Biol. Chem.* **274**, 19237-45.

- 
44. Rawal, N., Rajagopalan, R. & Salvi, V. P. (2009). Stringent regulation of complement lectin pathway C3/C5 convertase by C4b-binding protein (C4BP). *Mol. Immunol.* **46**, 2902-10.
  45. Ziccardi, R. J., Dahlbäck, B. & Müller-Eberhard, H. J. (1984). Characterization of the interaction of human C4b-binding protein with physiological ligands. *J. Biol. Chem.* **259**, 13674-9.
  46. Villoutreix, B. O., Hardig, Y., Wallqvist, A., Covell, D. G., Garcia de Frutos, P. & Dahlbäck, B. (1998). Structural investigation of C4b-binding protein by molecular modeling: localization of putative binding sites. *Proteins* **31**, 391-405.
  47. Trouw, L. A., Nielsen, H. M., Minthon, L., Londos, E., Landberg, G., Veerhuis, R., Janciauskiene, S. & Blom, A. M. (2008). C4b-binding protein in Alzheimer's disease: binding to Abeta1-42 and to dead cells. *Mol. Immunol.* **45**, 3649-60.
  48. Sjölander, J., Westermarck, G. T., Renstrom, E. & Blom, A. M. (2012). Islet amyloid polypeptide triggers limited complement activation and binds complement inhibitor C4b-binding protein, which enhances fibril formation. *J. Biol. Chem.* **287**, 10824-33.
  49. Sjöberg, A. P., Trouw, L. A., McGrath, F. D., Hack, C. E. & Blom, A. M. (2006). Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein. *J. Immunol.* **176**, 7612-20.
  50. Criado Garcia, O., Sanchez-Corral, P. & Rodriguez de Cordoba, S. (1995). Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines. *J. Immunol.* **155**, 4037-43.
  51. Esparza-Gordillo, J., Soria, J. M., Buil, A., Souto, J. C., Almasy, L., Blangero, J., Fontcuberta, J. & de Cordoba, S. R. (2003). Genetic determinants of variation in the plasma levels of the C4b-binding protein (C4BP) in Spanish families. *Immunogenetics* **54**, 862-6.
  52. Martin, M., Gottsater, A., Nilsson, P. M., Mollnes, T. E., Lindblad, B. & Blom, A. M. (2009). Complement activation and plasma levels of C4b-binding protein in critical limb ischemia patients. *J. Vasc. Surg.* **50**, 100-6.
  53. Blom, A. M., Villoutreix, B. O. & Dahlbäck, B. (2004). Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol. Immunol.* **40**, 1333-46.

- 
54. Ho, D. K., Riva, R., Kirjavainen, V., Jarva, H., Ginstrom, E., Blom, A. M., Skurnik, M. & Meri, S. (2012). Functional Recruitment of the Human Complement Inhibitor C4BP to *Yersinia pseudotuberculosis* Outer Membrane Protein Ail. *J. Immunol.* **188**, 4450-9.
55. Ho, D. K., Tissari, J., Jarvinen, H. M., Blom, A. M., Meri, S. & Jarva, H. (2011). Functional recruitment of human complement inhibitor C4B-binding protein to outer membrane protein Rck of *Salmonella*. *PLoS ONE* **6**, e27546.
56. Dervillez, X., Huther, A., Schuhmacher, J., Griesinger, C., Cohen, J. H., von Laer, D. & Dietrich, U. (2006). Stable expression of soluble therapeutic peptides in eukaryotic cells by multimerisation: application to the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46. *ChemMedChem* **1**, 330-9.
57. Draper, S. J., Moore, A. C., Goodman, A. L., Long, C. A., Holder, A. A., Gilbert, S. C., Hill, F. & Hill, A. V. (2008). Effective induction of high-titer antibodies by viral vector vaccines. *Nat. Med.* **14**, 819-21.
58. Kessel, C., Kreuz, W., Klich, K., Becker-Peters, K., Vorpahl, F., Dietrich, U., Klingebiel, T. & Konigs, C. (2009). Multimerization of peptide mimotopes for blocking of factor VIII neutralizing antibodies. *ChemMedChem* **4**, 1364-70.
59. Ogun, S. A., Dumon-Seignovert, L., Marchand, J. B., Holder, A. A. & Hill, F. (2008). The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria. *Infect. Immun.* **76**, 3817-23.
60. Jenkins, H. T., Mark, L., Ball, G., Persson, J., Lindahl, G., Uhrin, D., Blom, A. M. & Barlow, P. N. (2006). Human C4b-binding protein, structural basis for interaction with streptococcal M protein, a major bacterial virulence factor. *J. Biol. Chem.* **281**, 3690-7.
61. Gjelstrup, L. C., Andersen, S. H., Petersen, S. V., Enghild, J. J., Blom, A. M., Vorup-Jensen, T. & Thiel, S. (2011). The role of higher-order protein structure in supporting binding by heteroclitic monoclonal antibodies: the monoclonal antibody KIM185 to CD18 also binds C4-binding protein. *Mol. Immunol.* **49**, 38-47.
62. Luckgei, N., Habenstein, B., Ravotti, F., Megy, S., Penin, F., Marchand, J.-B., Hill, F., Böckmann, A. & Meier, B. (2012). Solid-state NMR sequential assignments of the C-

- terminal oligomerization domain of human C4b-binding protein. *Biomol. NMR Assign.*, 1-6.
63. Libyh, M. T., Goossens, D., Oudin, S., Gupta, N., Dervillez, X., Juszczak, G., Cornillet, P., Bougy, F., Reveil, B., Philbert, F., Tabary, T., Klatzmann, D., Rouger, P. & Cohen, J. H. (1997). A recombinant human scFv anti-Rh(D) antibody with multiple valences using a C-terminal fragment of C4-binding protein. *Blood* **90**, 3978-83.
  64. Shinya, E., Dervillez, X., Edwards-Levy, F., Duret, V., Brisson, E., Ylisastigui, L., Levy, M. C., Cohen, J. H. & Klatzmann, D. (1999). In-vivo delivery of therapeutic proteins by genetically-modified cells: comparison of organoids and human serum albumin alginate-coated beads. *Biomed. Pharmacother.* **53**, 471-83.
  65. Christiansen, D., Devaux, P., Reveil, B., Evlashev, A., Horvat, B., Lamy, J., Rabourdin-Combe, C., Cohen, J. H. & Gerlier, D. (2000). Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* **74**, 4672-8.
  66. Oudin, S., Libyh, M. T., Goossens, D., Dervillez, X., Philbert, F., Reveil, B., Bougy, F., Tabary, T., Rouger, P., Klatzmann, D. & Cohen, J. H. (2000). A soluble recombinant multimeric anti-Rh(D) single-chain Fv/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes. *J. Immunol.* **164**, 1505-13.
  67. Shinya, E., Owaki, A., Norose, Y., Sato, S. & Takahashi, H. (2009). Quick method of multimeric protein production for biologically active substances such as human GM-CSF (hGM-CSF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 40-4.
  68. Spencer, A. J., Hill, F., Honeycutt, J. D., Cottingham, M. G., Bregu, M., Rollier, C. S., Furze, J., Draper, S. J., Sogaard, K. C., Gilbert, S. C., Wyllie, D. H. & Hill, A. V. (2012). Fusion of the Mycobacterium tuberculosis antigen 85A to an oligomerization domain enhances its immunogenicity in both mice and non-human primates. *PLoS ONE* **7**, e33555.
  69. Forbes, E. K., de Cassan, S. C., Llewellyn, D., Biswas, S., Goodman, A. L., Cottingham, M. G., Long, C. A., Pleass, R. J., Hill, A. V., Hill, F. & Draper, S. J. (2012). T cell responses induced by adenoviral vectored vaccines can be adjuvanted by fusion of antigen to the oligomerization domain of C4b-binding protein. *PLoS ONE* **7**, e44943.
  70. Goodman, A. L., Forbes, E. K., Williams, A. R., Douglas, A. D., de Cassan, S. C., Bauza, K., Biswas, S., Dicks, M. D. J., Llewellyn, D., Moore, A. C., Janse, C. J., Franke-Fayard, B. M.,

- 
- Gilbert, S. C., Hill, A. V. S., Pleass, R. J. & Draper, S. J. (2013). The utility of *Plasmodium berghei* as a rodent model for anti-merozoite malaria vaccine assessment. *Sci. Rep.* **3**.
71. Hildinger, M., Dittmar, M. T., Schult-Dietrich, P., Fehse, B., Schnierle, B. S., Thaler, S., Stiegler, G., Welker, R. & von Laer, D. (2001). Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J. Virol.* **75**, 3038-42.
  72. Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R. & Bolognesi, D. (2004). Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 215-25.
  73. Sista, P. R., Melby, T., Davison, D., Jin, L., Mosier, S., Mink, M., Nelson, E. L., DeMasi, R., Cammack, N., Salgo, M. P., Matthews, T. J. & Greenberg, M. L. (2004). Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *AIDS* **18**, 1787-94.
  74. Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinius, H., Schult-Dietrich, P., Melikyan, G., Kunert, R., Baum, C., Choi, I., Alexandrov, A. & von Laer, D. (2004). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* **78**, 568-75.
  75. Poveda, E., Rodes, B., Toro, C., Martin-Carbonero, L., Gonzalez-Lahoz, J. & Soriano, V. (2002). Evolution of the gp41 env region in HIV-infected patients receiving T-20, a fusion inhibitor. *AIDS* **16**, 1959-61.
  76. Daly, T. M. & Long, C. A. (1993). A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect. Immun.* **61**, 2462-7.
  77. Kumar, S., Collins, W., Egan, A., Yadava, A., Garraud, O., Blackman, M. J., Guevara Patino, J. A., Diggs, C. & Kaslow, D. C. (2000). Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* **68**, 2215-23.
  78. Hawkrigde, T., Scriba, T. J., Gelderbloem, S., Smit, E., Tameris, M., Moyo, S., Lang, T., Veldsman, A., Hatherill, M., Merwe, L., Fletcher, H. A., Mahomed, H., Hill, A. V., Hanekom, W. A., Hussey, G. D. & McShane, H. (2008). Safety and immunogenicity of a new



- tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J. Infect. Dis.* **198**, 544-52.
79. Tameris, M. D., Hatherill, M., Landry, B. S., Scriba, T. J., Snowden, M. A., Lockhart, S., Shea, J. E., McClain, J. B., Hussey, G. D., Hanekom, W. A., Mahomed, H. & McShane, H. (2013). Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *The Lancet* **381**, 1021-1028.
80. Delamarre, L., Couture, R., Mellman, I. & Trombetta, E. S. (2006). Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J. Exp. Med.* **203**, 2049-55.
81. Nicaud, J. M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **29**, 409-18.
82. van der Walt, J. P. & von Arx, J. A. (1980). The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *A. van Leeuw. J. Microb.* **46**, 517-21.
83. Yarrow, D. (1972). Four new combinations in yeasts. *A. van Leeuw. J. Microb.* **38**, 357-60.
84. Nakase, T. & Komagata, K. (1971). Significance of DNA base composition in the classification of yeast genus *Saccharomyces*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **17**, 227-238.
85. Suzuki, M., Suh, S. O., Sugita, T. & Nakase, T. (1999). A phylogenetic study on galactose-containing *Candida* species based on 18S ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45**, 229-238.
86. Barth, G. & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 219-37.
87. Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A. & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol. Lett.* **244**, 229-34.
88. Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S. & Nicaud, J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* **5**, 527-43.
89. Ruiz-Herrera, J. & Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch. Microbiol.* **178**, 477-83.

- 
90. Spencer, J. F., Ragout de Spencer, A. L. & Laluece, C. (2002). Non-conventional yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 147-56.
91. Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. & Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44.
92. Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P. & Dalboge, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267-83.
93. Davidow, L. S., O'Donnell, M. M., Kaczmarek, F. S., Pereira, D. A., DeZeeuw, J. R. & Franke, A. E. (1987). Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **169**, 4621-9.
94. Nicaud, J. M., Fabre, E. & Gaillardin, C. (1989). Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.* **16**, 253-60.
95. Madzak, C., Treton, B. & Blanchin-Roland, S. (2000). Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 207-16.
96. Blazeck, J., Liu, L., Redden, H. & Alper, H. (2011). Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7905-14.
97. Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C. & Beckerich, J. M. (2005). Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* **5**, 635-46.

- 
98. Nicaud, J. M., Madzak, C., van den Broek, P., Gysler, C., Duboc, P., Niederberger, P. & Gaillardin, C. (2002). Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* **2**, 371-9.
  99. Fickers, P., Fudalej, F., Nicaud, J. M., Destain, J. & Thonart, P. (2005). Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* **115**, 379-86.
  100. Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M. & Nicaud, J. M. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **182**, 2802-10.
  101. Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P. & Zarkesh-Esfahani, H. (2011). High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. *N. Biotechnol.* **28**, 756-60.
  102. Destain, J., Roblain, D. & Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **19**, 105-108.
  103. Fickers, P., Nicaud, J. M., Destain, J. & Thonart, P. (2003). Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 136-42.
  104. Pignede, G., Wang, H. J., Fudalej, F., Seman, M., Gaillardin, C. & Nicaud, J. M. (2000). Autocloning and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3283-9.
  105. Roth, R., Moodley, V. & van Zyl, P. (2009). Heterologous expression and optimized production of an *Aspergillus aculeatus* endo-1,4-beta-mannanase in *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Biotechnol.* **43**, 112-20.
  106. Park, C. S., Chang, C. C., Kim, J. Y., Ogrydziak, D. M. & Ryu, D. D. (1997). Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **272**, 6876-81.
  107. Tharaud, C., Ribet, A. M., Costes, C. & Gaillardin, C. (1992). Secretion of human blood coagulation factor XIIIa by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **121**, 111-9.
  108. De Pourcq, K., Vervecken, W., Dewerte, I., Valevska, A., Van Hecke, A. & Callewaert, N. (2012). Engineering the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of therapeutic

- proteins homogeneously glycosylated with Man(8)GlcNAc(2) and Man(5)GlcNAc(2). *Microb. Cell. Fact.* **11**, 53.
109. Hofmeyer, T., Bulani, S., Grzeschik, J., Krah, S., Glotzbach, B., Uth, C., Avrutina, O., Brecht, M., Göringer, H., Zyl, P. & Kolmar, H. (2013b). Protein Production in *Yarrowia lipolytica* Via Fusion to the Secreted Lipase Lip2p. *Mol. Biotechnol.*, (DOI: 10.1007/s12033-013-9684-2).
  110. Felizmenio-Quimio, M. E., Daly, N. L. & Craik, D. J. (2001). Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 22875-82.
  111. Heitz, A., Chiche, L., Le-Nguyen, D. & Castro, B. (1989). <sup>1</sup>H <sup>2</sup>D NMR and distance geometry study of the folding of Ecballium elaterium trypsin inhibitor, a member of the squash inhibitors family. *Biochemistry (Mosc.)* **28**, 2392-8.
  112. Kolmar, H. (2011). Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 4329-36.
  113. Chan, L. Y., Gunasekera, S., Henriques, S. T., Worth, N. F., Le, S. J., Clark, R. J., Campbell, J. H., Craik, D. J. & Daly, N. L. (2011). Engineering pro-angiogenic peptides using stable, disulfide-rich cyclic scaffolds. *Blood* **118**, 6709-17.
  114. Mylne, J. S., Chan, L. Y., Chanson, A. H., Daly, N. L., Schaefer, H., Bailey, T. L., Nguyencong, P., Cascales, L. & Craik, D. J. (2012). Cyclic peptides arising by evolutionary parallelism via asparaginyl-endopeptidase-mediated biosynthesis. *Plant Cell* **24**, 2765-78.
  115. Glotzbach, B. (2013). Isolierung und Charakterisierung hochaffiner Cystinknoten-basierter Matriptase-1 Inhibitoren. *Doktorarbeit*, Technische Universität Darmstadt.
  116. Conrath, K., Vincke, C., Stijlemans, B., Schymkowitz, J., Decanniere, K., Wyns, L., Muyldermans, S. & Loris, R. (2005). Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J. Mol. Biol.* **350**, 112-25.
  117. De Genst, E., Saerens, D., Muyldermans, S. & Conrath, K. (2006). Antibody repertoire development in camelids. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 187-98.
  118. Harmsen, M. M. & De Haard, H. J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 13-22.

- 
119. van der Linden, R. H., Frenken, L. G., de Geus, B., Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., Stok, W., de Ron, L., Wilson, S., Davis, P. & Verrips, C. T. (1999). Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 37-46.
  120. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. & Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-8.
  121. Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* **74**, 277-302.
  122. Avigad, G., Amaral, D., Asensio, C. & Horecker, B. L. (1962). The D-galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. *J. Biol. Chem.* **237**, 2736-43.
  123. Cooper, J. A., Smith, W., Bacila, M. & Medina, H. (1959). Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, *Fr. J. Biol. Chem.* **234**, 445-8.
  124. Whittaker, M. M., Ballou, D. P. & Whittaker, J. W. (1998). Kinetic isotope effects as probes of the mechanism of galactose oxidase. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 8426-36.
  125. Whittaker, M. M. & Whittaker, J. W. (1988). The active site of galactose oxidase. *J. Biol. Chem.* **263**, 6074-80.
  126. Adányi, N., Szabó, E. E. & Váradi, M. (1999). Multi-enzyme biosensors with amperometric detection for determination of lactose in milk and dairy products. *Eur. Food Res. Technol.* **209**, 220-226.
  127. Szabo, E. E., Adanyi, N. & Varadi, M. (1996). Application of biosensor for monitoring galactose content. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 1051-8.
  128. Yalpani, M. & Hall, L. D. (1982). Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. II. A high-yielding, specific method for the chemical derivatization of galactose-containing polysaccharides: Oxidation with galactose oxidase followed by reductive amination. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **20**, 3399-3420.
  129. Carter, J. H., Deddens, J. A., Pullman, J. L., Colligan, B. M., Whiteley, L. O. & Carter, H. W. (1997). Validation of the galactose oxidase-Schiff's reagent sequence for early detection and prognosis in human colorectal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1479-89.

- 
130. Said, I. T., Shamsuddin, A. M., Sherief, M. A., Taleb, S. G., Aref, W. F. & Kumar, D. (1999). Comparison of different techniques for detection of Gal-GalNAc, an early marker of colonic neoplasia. *Histol. Histopathol.* **14**, 351-7.
  131. Vrbova, E., Peckova, J. & Marek, M. (1992). Preparation and utilization of a biosenor based on galactose oxidase. *Collect. Czech. Chem. Comm.* **57**, 2287-2294.
  132. Wood, W. B. (1966). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* **16**, 118-33.
  133. Maeda, T., Mazzulli, J. R., Farrance, I. K. & Stewart, A. F. (2002). Mouse DTEF-1 (ETFR-1, TEF-5) is a transcriptional activator in alpha 1-adrenergic agonist-stimulated cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 24346-52.
  134. Rogers, L. M., Kim, Y. K., Guo, W., Gonzalez-Candelas, L., Li, D. & Kolattukudy, P. E. (2000). Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9813-8.
  135. Dutta, S., Ware, L. A., Barbosa, A., Ockenhouse, C. F. & Lanar, D. E. (2001). Purification, characterization, and immunogenicity of a disulfide cross-linked *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigen, merozoite surface protein 1, expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**, 5464-70.
  136. Qiu, J., Swartz, J. R. & Georgiou, G. (1998). Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4891-6.
  137. Swennen, D., Paul, M. F., Vernis, L., Beckerich, J. M., Fournier, A. & Gaillardin, C. (2002). Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* **148**, 41-50.
  138. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
  139. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-45.
  140. Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G. (1992). Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug. Chem.* **3**, 138-46.

- 
141. Uth, C. (2011). Towards synthetic bioconjugates for targeted delivery of a cytotoxic drug to *trypanosoma brucei*. *Diplomarbeit*, Technische Universität Darmstadt.
  142. Cross, G. A. (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **71**, 393-417.
  143. Hirumi, H. & Hirumi, K. (1994). Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms. *Parasitol. Today* **10**, 80-84.
  144. Lorger, M., Engstler, M., Homann, M. & Goring, H. U. (2003). Targeting the variable surface of African trypanosomes with variant surface glycoprotein-specific, serum-stable RNA aptamers. *Eukaryot. Cell* **2**, 84-94.
  145. Arner, E. S. & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-9.
  146. LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. & McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology. (N. Y.)* **11**, 187-93.
  147. French, C. S. & Milner, H. W. (1955). [9] Disintegration of bacteria and small particles by high-pressure extrusion. In *Methods Enzymol.*, Vol. 1, pp. 64-67. Academic Press.
  148. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
  149. Schagger, H. v. J., G. . (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
  150. Meyer, T. S. & Lamberts, B. L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-5.
  151. Schagger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-31.



- 
152. Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-9.
  153. Swanson, J., Mayer, L. W. & Tam, M. R. (1982). Antigenicity of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane protein(s) III detected by immunoprecipitation and Western blot transfer with a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **38**, 668-72.
  154. Pace CN, V. F., Fee L, Grimsley G, Gray T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science.* **4** 2411-2423.
  155. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
  156. Nunn, C. M., Jeeves, M., Cliff, M. J., Urquhart, G. T., George, R. R., Chao, L. H., Tscuchia, Y. & Djordjevic, S. (2005). Crystal structure of tobacco etch virus protease shows the protein C terminus bound within the active site. *J. Mol. Biol.* **350**, 145-55.
  157. Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A. & Dougherty, W. G. (1994). Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal. Biochem.* **216**, 413-7.
  158. Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Peters, H. K., 3rd, Kapust, R. B., Li, M., Wlodawer, A. & Waugh, D. S. (2002). Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *J. Biol. Chem.* **277**, 50564-72.
  159. Kapust, R. B., Tozser, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. (2002). The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 949-55.
  160. Tamilarasu, N., Zhang, J., Hwang, S. & Rana, T. M. (2001). A new strategy for site-specific protein modification: analysis of a Tat peptide-TAR RNA interaction. *Bioconjug. Chem.* **12**, 135-8.
  161. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119-39.
  162. Avrutina, O., Schmoldt, H. U., Gabrijelcic-Geiger, D., Le Nguyen, D., Sommerhoff, C. P., Diederichsen, U. & Kolmar, H. (2005). Trypsin inhibition by macrocyclic and open-chain variants of the squash inhibitor MCoTI-II. *Biol. Chem.* **386**, 1301-6.

- 
163. Glotzbach, B., Schmelz, S., Reinwarth, M., Christmann, A., Heinz, D. W. & Kolmar, H. (2013). Structural characterization of *Spinacia oleracea* trypsin inhibitor III (SOTI-III). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 114-20.
  164. Morrison, J. F. (1969). Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 269-86.
  165. Baron, A. J., Stevens, C., Wilmot, C., Seneviratne, K. D., Blakeley, V., Dooley, D. M., Phillips, S. E., Knowles, P. F. & McPherson, M. J. (1994). Structure and mechanism of galactose oxidase. The free radical site. *J. Biol. Chem.* **269**, 25095-105.
  166. Porath, J. (1988). High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. *J. Chromatogr.* **443**, 3-11.
  167. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-9.
  168. Sharp, P. A., Sugden, B. & Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry (Mosc.)* **12**, 3055-63.
  169. Mullis, K. B. (1994 ). The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1209-1213.
  170. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-50.
  171. Liu, H. & Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* **8**, 91.
  172. Feinweber, C. (2013). Das C4BP als strukturelles Grundgerüst für die orts-spezifische Positionierung biologischer Makromoleküle. *Diplomarbeit*, Technische Universität Darmstadt.
  173. Hofmeyer, T. (2009). Oligomerisierung von Peptiden und Proteinen über die C-terminale  $\alpha$ -Domäne des humanen C4b-Bindeproteins. *Diplomarbeit*, Technische Universität Darmstadt.

- 
174. Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry (Mosc.)* **8**, 4108-16.
  175. Usón, I. & Sheldrick, G. M. (1999). Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 643-648.
  176. Taylor, G. L. (2010). Introduction to phasing. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 325-38.
  177. Corsini, L., Hothorn, M., Scheffzek, K., Sattler, M. & Stier, G. (2008). Thioredoxin as a fusion tag for carrier-driven crystallization. *Protein Sci.* **17**, 2070-2079.
  178. Niemann, H. H., Schmoldt, H. U., Wentzel, A., Kolmar, H. & Heinz, D. W. (2006). Barnase fusion as a tool to determine the crystal structure of the small disulfide-rich protein McoEeTl. *J. Mol. Biol.* **356**, 1-8.
  179. Hendrickson, W. A. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**, 51-8.
  180. Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125-32.
  181. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213-21.
  182. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-32.
  183. Dahlbäck, B. & Müller-Eberhard, H. J. (1984). Ultrastructure of C4b-binding protein fragments formed by limited proteolysis using chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **259**, 11631-4.
  184. Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774-97.
  185. Prodromou, C. & Pearl, L. H. (1992). Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.* **5**, 827-9.

- 
186. Kristensen, T., Ogata, R. T., Chung, L. P., Reid, K. B. & Tack, B. F. (1987). cDNA structure of murine C4b-binding protein, a regulatory component of the serum complement system. *Biochemistry (Mosc.)* **26**, 4668-74.
  187. de Córdoba, S. R. g., Pérez-Blas, M., Ramos-Ruiz, R., Sánchez-Corral, P., de Villena, F. P.-M. & Rey-Campos, J. (1994). The Gene Coding for the  $\beta$ -Chain of C4b-Binding Protein (C4BPB) Has Become a Pseudogene in the Mouse. *Genomics* **21**, 501-509.
  188. Kask, L., Villoutreix, B. O., Steen, M., Ramesh, B., Dahlbäck, B. & Blom, A. M. (2004). Structural stability and heat-induced conformational change of two complement inhibitors: C4b-binding protein and factor H. *Protein Sci.* **13**, 1356-64.
  189. Magliery, T. J., Lavinder, J. J. & Sullivan, B. J. (2011). Protein stability by number: high-throughput and statistical approaches to one of protein science's most difficult problems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 443-51.
  190. Stewart, E. J., Aslund, F. & Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* **17**, 5543-50.
  191. Gogarten, J. P., Senejani, A. G., Zhaxybayeva, O., Olendzenski, L. & Hilario, E. (2002). Inteins: structure, function, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 263-87.
  192. Perler, F. B. (2002). InBase: the Intein Database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 383-4.
  193. Perler, F. B., Davis, E. O., Dean, G. E., Gimble, F. S., Jack, W. E., Neff, N., Noren, C. J., Thorner, J. & Belfort, M. (1994). Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1125-7.
  194. Ludwig, C., Pfeiff, M., Linne, U. & Mootz, H. D. (2006). Ligation of a synthetic peptide to the N terminus of a recombinant protein using semisynthetic protein trans-splicing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 5218-21.
  195. Volkmann, G. & Mootz, H. D. (2013). Recent progress in intein research: from mechanism to directed evolution and applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1185-206.
  196. Xu, M. Q. & Perler, F. B. (1996). The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J.* **15**, 5146-53.

- 
197. Ludwig, C., Schwarzer, D. & Mootz, H. D. (2008). Interaction studies and alanine scanning analysis of a semi-synthetic split intein reveal thiazoline ring formation from an intermediate of the protein splicing reaction. *J. Biol. Chem.* **283**, 25264-72.
  198. Webb, C. T., Gorman, M. A., Lazarou, M., Ryan, M. T. & Gulbis, J. M. (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol. Cell* **21**, 123-33.
  199. Kammerer, R. A. (1997). Alpha-helical coiled-coil oligomerization domains in extracellular proteins. *Matrix Biol.* **15**, 555-65; discussion 567-8.
  200. Özbek, S., Engel, J. & Stetefeld, J. (2002). Storage function of cartilage oligomeric matrix protein: the crystal structure of the coiled-coil domain in complex with vitamin D(3). *EMBO J.* **21**, 5960-8.
  201. Zhu, X., Wang, L., Liu, R., Flutter, B., Li, S., Ding, J., Tao, H., Liu, C., Sun, M. & Gao, B. (2010). COMBODY: one-domain antibody multimer with improved avidity. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 667-75.
  202. Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**, 665-79.
  203. Williams, G. J., Johnson, K., Rudolf, J., McMahon, S. A., Carter, L., Oke, M., Liu, H., Taylor, G. L., White, M. F. & Naismith, J. H. (2006). Structure of the heterotrimeric PCNA from *Sulfolobus solfataricus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 944-8.
  204. Liu, J., Zheng, Q., Deng, Y., Cheng, C. S., Kallenbach, N. R. & Lu, M. (2006). A seven-helix coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15457-62.
  205. Tugyi, R., Uray, K., Ivan, D., Feller, E., Perkins, A. & Hudecz, F. (2005). Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 413-8.
  206. Dintzis, H. M., Symer, D. E., Dintzis, R. Z., Zawadzke, L. E. & Berg, J. M. (1993). A comparison of the immunogenicity of a pair of enantiomeric proteins. *Proteins* **16**, 306-8.
  207. Popp, M. W., Antos, J. M. & Ploegh, H. L. (2009). Site-specific protein labeling via sortase-mediated transpeptidation. *Curr. Protoc. Protein. Sci.* **Chapter 15**, Unit 15 3.

- 
208. Popp, M. W., Antos, J. M., Grotenbreg, G. M., Spooner, E. & Ploegh, H. L. (2007). Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 707-8.
209. Mao, H., Hart, S. A., Schink, A. & Pollok, B. A. (2004). Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2670-1.
210. Chen, I., Dorr, B. M. & Liu, D. R. (2011). A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11399-404.
211. Bulani, S. I., Moleleki, L., Albertyn, J. & Moleleki, N. (2012). Development of a novel rDNA based plasmid for enhanced cell surface display on *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express* **2**, 27.
212. Xuan, J.-W., Fournier, P. & Gaillardin, C. (1988). Cloning of the LYS5 gene encoding saccharopine dehydrogenase from the yeast *Yarrowia lipolytica* by target integration. *Curr. Genet.* **14**, 15-21.
213. Chen, D. C., Beckerich, J. M. & Gaillardin, C. (1997). One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 232-5.
214. Tischler, M., Nasu, D., Empting, M., Schmelz, S., Heinz, D. W., Rottmann, P., Kolmar, H., Buntkowsky, G., Tietze, D. & Avrutina, O. (2012). Braces for the peptide backbone: insights into structure-activity relationships of protease inhibitor mimics with locked amide conformations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 3708-12.
215. Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3240-4.
216. Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. & Riggs, A. D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 106-10.
217. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. & Boyer, H. W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**, 1056-63.
218. Sørensen, H. P. (2010). Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb. Cell. Fact.* **9**, 27.

- 
219. Ukkonen, K., Vasala, A., Ojamo, H. & Neubauer, P. (2011). High-yield production of biologically active recombinant protein in shake flask culture by combination of enzyme-based glucose delivery and increased oxygen transfer. *Microb. Cell. Fact.* **10**, 107.
220. Haas, M., Cichowicz, D. & Bailey, D. (1992). Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids* **27**, 571-576.
221. Sharp, P. M., Tuohy, T. M. & Mosurski, K. R. (1986). Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5125-43.
222. Zhang, B., Rong, C., Chen, H., Song, Y., Zhang, H. & Chen, W. (2012). De novo synthesis of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell. Fact.* **11**, 51.
223. Madzak, C., Gaillardin, C. & Beckerich, J. M. (2004). Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.* **109**, 63-81.
224. Rahbarizadeh, F., Rasaee, M. J., Forouzandeh, M. & Allameh, A. A. (2006). Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Immunol.* **43**, 426-35.
225. Rahbarizadeh, F., Rasaee, M. J., Forouzandeh-Moghadam, M. & Allameh, A. A. (2005). High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **44**, 32-8.
226. Frenken, L. G., van der Linden, R. H., Hermans, P. W., Bos, J. W., Ruuls, R. C., de Geus, B. & Verrips, C. T. (2000). Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **78**, 11-21.
227. Schmoldt, H. U., Wentzel, A., Becker, S. & Kolmar, H. (2005). A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide bond rich cystine knot peptides using barnase as a purification handle. *Protein Expr. Purif.* **39**, 82-9.
228. Silverman, A. P., Levin, A. M., Lahti, J. L. & Cochran, J. R. (2009). Engineered cystine-knot peptides that bind  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin with antibody-like affinities. *J. Mol. Biol.* **385**, 1064-75.



- 
229. Sun, L., Petrounia, I. P., Yagasaki, M., Bandara, G. & Arnold, F. H. (2001). Expression and stabilization of galactose oxidase in *Escherichia coli* by directed evolution. *Protein Eng.* **14**, 699-704.
230. Wentzel, A., Christmann, A., Kratzner, R. & Kolmar, H. (1999). Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.* **274**, 21037-43.
231. Reinwarth, M., Glotzbach, B., Tomaszowski, M., Fabritz, S., Avrutina, O. & Kolmar, H. (2013). Oxidative folding of peptides with cystine-knot architectures: kinetic studies and optimization of folding conditions. *ChemBioChem* **14**, 137-46.

---

## 7 Anhang

---

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$ )
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C4BP	<i>complement component 4b binding protein</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CD	Circulardichroismus
Cm	Chloramphenicol
Cys	Cystein
D	nicht C (A, G oder T)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dYT	<i>double concentrated Yeast Tryptone</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionisierungsverfahren in der MS)
evtl.	eventuell
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>

---

G	Guanin
GFC	Gelfiltrationschromatographie
h	Stunde
H	nicht G (A, C oder T)
IMAC	<i>Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography</i>
k	Kilo
kDa	Kilo Dalton
LCMS	<i>liquid chromatography mass spectroscopy</i>
mAb	monoklonaler Antikörper
MITat	<i>Molteno Institute Trypanozoon antigen type</i>
monodest.	einfach destilliert
Mr	relatives Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MTA	<i>material transfer agreement</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
Pro	Prolin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
SeMet	Selenomethionin
T	Thymin

---

---

Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vvm	<i>volume per volume per minute</i>
vgl.	vergleiche
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	<i>wild type</i>
z.B.	zum Beispiel

---

## 7.2 Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung von Prof. Dr. Harald Kolmar in folgenden Beiträgen vorabveröffentlicht:

### Artikel:

Hofmeyer, T., Schmelz, S., Degiacomi, M. T., Dal Peraro, M., Daneschdar, M., Scrima, A., van den Heuvel, J., Heinz, D. W. & Kolmar, H. (2013a). Arranged Sevenfold: Structural Insights into the C-Terminal Oligomerization Domain of Human C4b-Binding Protein. *J. Mol. Biol.* **425**, 1302-17.

Hofmeyer, T., Bulani, S., Grzeschik, J., Krah, S., Glotzbach, B., Uth, C., Avrutina, O., Brecht, M., Göringer, H., Zyl, P. & Kolmar, H. (2013b). Protein Production in *Yarrowia lipolytica* Via Fusion to the Secreted Lipase Lip2p. *Mol. Biotechnol.*, (DOI: 10.1007/s12033-013-9684-2).

### Tagungsbeiträge:

Doktorandentag (2012) Darmstadt, Vortrag und Poster

*Minisymposium Microbial Protein Production* (2012) Darmstadt, Vortrag

PEGS Europe (2012) Wien, Poster

### Pressemitteilungen:

Auf den Internetseiten der Technischen Universität Darmstadt und des HZI Braunschweig (2013), Protein in Spinnengestalt (*Protein shaped like a spider*)

---

### 7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Entstehung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Herr Prof. Harald Kolmar möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des spannenden Themas, die angenehme Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Ohne dieses Vertrauen und die wissenschaftliche Unterstützung wäre die Realisierung dieser Arbeit unmöglich gewesen. Vielen Dank für eine großartige Zeit in Darmstadt und Südafrika.

Prof. Siegfried Neumann danke ich für die Übernahme des Korreferats. Prof. Heribert Warzecha und Prof. Gerhard Thiel danke ich für ihre Mitarbeit in der Prüfungskommission und Jr. Prof. Annette Brunsen danke ich für die spontane Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei den Kooperationspartnern Dr. Stefan Schmelz und Dr. Joop van den Heuvel vom HZI für Infektionsforschung in Braunschweig möchte ich mich für die ausdauernde wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken, die nach Jahren der Forschung und Fehlschläge schließlich zum Ziel führte. Matteo T. Degiacomi möchte ich für seinen *in silico* Beitrag zum C4BP-Projekt danken.

Den südafrikanischen Kooperationspartnern Dr. Petrus van Zyl und Dr. Siyavuya Ishmael Bulani möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit bei dem *Y. lipolytica* Projekt und ihre herzliche Gastfreundschaft danken. Vor allem Siya möchte ich für eine unvergessliche Zeit in einem wundervollen Land danken.

Den Kooperationspartnern Michael Brecht und Prof. H. Ulrich Göringer danke ich für die Zusammenarbeit bei der Evaluierung des in *Y. lipolytica* produzierten Tryp-VHH.

Barbara danke ich für Ordnung im Chaos, schnelle, unkomplizierte Hilfe in bürokratischen Wirren und angenehme Unterhaltungen über nicht chemische Dinge. Young-In danke ich für eine aufregende und wundervolle Zeit, für moralische Unterstützung, Bulgogi und Otinga. Bernhard danke ich für die Unterstützung, Verständnis und Freundschaft in den guten und weniger guten Tagen in der Knochenmühle und Säuremine. Der Teufel ist ein Eichhörnchen. Simon und Julius danke ich für ihre tatkräftige Mitarbeit am *Y. lipolytica* Projekt und ihr unerschütterliches Durchhaltevermögen. Manchmal dauert ein Praktikum eben doppelt so lange wie geplant, wobei uns die soziale Komponente trotzdem oder gerade deswegen auch über das Praktikumsende hinaus erhalten geblieben ist. Ich bedanke mich bei meinen Bench-Kollegen Stefan und Niklas für eine unvergessliche Laborzeit, gemeinsam durchgearbeitete Nächte und musikalische Horizonterweiterungen. Stefan, obwohl du aus Lorsch kommst und bei der Frage nach der besten Band der Welt bisweilen anderer Meinung zu sein scheinst, habe ich dich in

---

mein Herz geschlossen. Bei meinen Labor-Kollegen Simone, Sebastian H., Christina, Carolin, Franzi & Alex, Rebecca, Alex K., Carmen, Tim, Janine, Björn & Martin, Maren, Michael, Olga, Sebastian F., Heiko, Daichi, Norman, Stefan D., Bernhard V. und Nicolas für Freundschaft, Austausch, Zusammenarbeit, Übernachtungsmöglichkeiten, Wein, Kaffee, Kochkäse und Soleier. Den Mercklern Birgitt, Laura, Achim und Stefan danke ich für den wissenschaftlichen und materiellen Austausch und ernstzunehmende *social events*. Renè danke ich für eine sportliche und lehrreiche Zusammenarbeit rund um das Enzym Ni-SOD. Aus diesem Protein ist im Laufe der Zeit im Labgym mit Schweiß, Eiter, Tränen und TEV-Protease eine Freundschaft entstanden. Cäcilie Gorus danke ich für die jahrelange gute Zusammenarbeit und zuverlässige Unterstützung bei allen experimentellen Arbeiten.

Ich danke allen ehemaligen und momentanen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kolmar für den wissenschaftlichen und mentalen Beistand in Zeiten mit und ohne Pausengestaltungsmobiliar.

Nicht zuletzt danke ich allen Freunden und meiner Familie, die mich über die gesamte Zeit meines Studiums mit allen Höhen und Tiefen ertragen und nach Kräften unterstützt haben. Ihr habt auf diese Weise einen essentiellen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen. Ohne diese Unterstützung wäre jede Seite dieser Arbeit ein unbeschriebenes Blatt.



---

## 7.4 Erklärungen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Unterschrift

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Unterschrift

---

## 7.5 Abriss des Lebens- und Bildungsganges

Name: Thomas Hofmeyer

Geburtsdatum: 03.03.1981

Geburtsort: Bensheim

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1991-2000 Altes Kurfürstliches Gymnasium in Bensheim

Wehrpflicht: 2001-2002

Studium der Biologie: 2002-2009 an der Technischen Universität Darmstadt

Auslandsaufenthalt: 2005-2006 an der Universität de Barcelona, Erasmus-Stipendium

Diplomarbeit: 2009 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Harald Kolmar am Institut für Organische Chemie & Biochemie an der Technischen Universität Darmstadt. Titel der Diplomarbeit: „Oligomerisierung von Peptiden und Proteinen über die C-terminale  $\alpha$ -Domäne des humanen C4b-Bindeproteins.“

Dissertation: 2009-2013 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Harald Kolmar am Institut für Organische Chemie & Biochemie an der Technischen Universität Darmstadt. Titel der Dissertation: „Über die Charakterisierung und funktionelle Produktion der Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b-Bindeproteins.“

Unterschrift